



Tesis doctoral en Ciencias Médicas

***Terapia génica y reprogramación celular en
modelos animales de envejecimiento cerebral***

Autor: Lic. Joaquín Pardo

Director: Dr. Rodolfo G. Goya

Codirectores: Dres. Paula C. Reggiani y Gustavo R. Morel

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata `Profesor Doctor
Rodolfo R. Brenner`. Facultad de Cs. Médicas.**

Universidad Nacional de La Plata

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a las personas que han convivido conmigo la mayor parte del tiempo dedicado a la realización de mi tesis doctoral: Maia y mis padres, Lilián y Roberto. Además, quisiera agradecerle a todos aquellos que, desinteresadamente, me ayudaron y apoyaron para realizar mi proyecto.

Por otra parte, es imperioso agradecer a las instituciones que me han financiado mi proyecto:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Organización Internacional de Investigación del Cerebro (IBRO)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO)

Reconocimientos. Si bien es muy larga la lista de personas cuyo trabajo es de reconocer, sería injusto dejar de nombrarlos a todos aquellos que, de una u otra manera, me han ayudado.

- Integrantes presentes y pasados de nuestro laboratorio: Araceli Bigres, María José Bellini, Eugenia Falomir Lockhart, Rodolfo Goya, Claudia Hereñú, Marianne Lehmann, Micaela Lopez León, Natalia Scelsio, Gustavo Morel, Paula Reggiani, Ignacio Schwerdt, Yolanda Elena Sosa, Carolina Thomas, Oscar Vercellini, Maia Uriarte y Florencia Zappa.

- Otros integrantes de nuestro instituto: Rosana Crespo, Rosana del Cid, Marcos Dreón, Belén García Fabbiani, Horacio Garda, Yanina Pasquevich, Nahuel Ramella, Mario Ramos, Omar Rimoldi, Silvana Rosu, Alejandra Tricerri y Yoseli Quiroga.

- Investigadores del CINIBA que colaboraron con nosotros: Martín Abba y Ezequiel Lacunza.

- Integrantes del Departamento de Neurodegeneración Experimental de la Universidad de Medicina de Göttingen, en donde trabajé por 5 meses: Mariana Dias, Omar Díaz, Christiane Fahlbusch, Laetitia Francelle, Ellen Gerhardt, Tomás Fonseca, Diana Lázaro, Tiago Outeiro, Isabel Paiva, Raquel Pinho y Ana Villar Piqué.

- Olalekan Michael Ogundele, de la Universidad de Lousiana.

- Investigadores de la Universidad de Michigan: María Graciela Castro y Pedro Löwenstein.

- Mentores de la Escuela de Neurociencias de Montreal: Albert Aguayo, Ellis Cooper, Ante Padjen y David Ragsdale.
- Los investigadores que me ayudaron a poner a punto la técnica de Golgi en nuestro laboratorio: Néstor Carri (IMBICE), Juan Beauquis (IBYME) y Orlando Torres-Fernandez (Universidad Incca, Colombia).

Publicaciones científicas en Journals con referato

- 1) **Pardo J**, Abba MC, Lacunza E, Ogundele OM, Paiva I, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Jun 22. doi: 10.1093/gerona/glx125. [Epub ahead of print]
- 2) Zappa-Villar MF, López-León M, **Pardo J**, Costa M, Crespo R, Dardenne M, Goya RG, Reggiani PC. A new adenovector system for implementing thymulin gene therapy for inflammatory disorders. *Mol Immunol*. 2017 May 11;87:180-187.
- 3) Uriarte M, Ogundele OM, **Pardo J**. Long-lasting training in the Barnes maze prompts hippocampal spinogenesis and habituation in rats. *Neuroreport*. 2017 Apr 12;28(6):307-312.
- 4) **Pardo J**, Abba MC, Lacunza E, Francelle L, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. Identification of a conserved gene signature associated with an exacerbated inflammatory environment in the hippocampus of aging rats. *Hippocampus*. 2017 Apr;27(4):435-449.
- 5) **Pardo J**, Uriarte M, Cónsole GM, Reggiani PC, Outeiro TF, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *Eur J Neurosci*. 2016 Aug;44(4):2120-8.
- 6) Morel GR, Andersen T, **Pardo J**, Zuccolilli GO, Cambiaggi V, Hereñú CB, Goya RG; Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats; *Neuroscience* 2015. Sep 10;303:189-99.
- 7) **Pardo J**, Morel GR, Astiz M, Schwerdt JI, López León M, Rodríguez SS, Hereñú CB, Goya RG. “Gene therapy and cell reprogramming for the aging brain: achievements and promises.” *Current Gene Therapy* 2014. Feb; 14(1):24-34.
- 8) **Pardo J**, Sosa, YE, Reggiani PC, Arciniegas, ML, Sánchez, F y Goya, RG; Transferencia génica asistida por campos magnéticos: estudios en células gliales. *ActaBioqClinLatinoam*. 47 (2): 399-406 (2013).
- 9) **Pardo J**, Schwerdt JI, Reggiani PC, Zappa MF, Pereyra AS, Brown OA, Goya RG; Physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin; *Physiological Minireviews*, 2012. 6 (1). Pag 6-12.

Capítulos de libro

Pardo J, Morel GR, Bellini MJ, López-M, Pereyra AS, Brown OA, Goya RG; Neuroprotective gene therapy in the aging brain (capítulo de libro). Estrogens and cognition. Psychobiological and clinical aspects. **González-Burgos (Ed.)**; Research Signpost Publishers; Ontario, Canada; 2014. Pag 97-119.

INDICE

Prólogo	11
Abreviaturas	13
Resumen	16
Capítulo 1. Introducción	18
1.1. Envejecimiento cerebral y el modelo de la rata senil	18
1.2. Memoria espacial en ratas	19
1.3. El hipocampo de la rata	21
1.3.1. Anatomía, función y su modificación en el envejecimiento	21
1.3.2. Nicho neurogénico del Giro Dentado	23
1.3.3. Transcriptoma del hipocampo de la rata senil	24
1.4. Laberinto de Barnes: una herramienta para el estudio de la memoria espacial en roedores	25
1.5. IGF-I como molécula neuroprotectora	27
1.5.1. Bioquímica del IGF-I	27
1.5.2. Acción de proteínas insulino-símiles en el cerebro	29
1.5.3. Acción neuroprotectora del IGF-I	31
1.6. Terapia génica neuroprotectora y vectores virales	33
1.6.1. Generalidades	33
1.6.2. Terapia génica con IGF-I	33
1.7. Terapia celular neuroprotectora	35
Capítulo 2. Estudios sobre el impacto del Laberinto de Barnes en el hipocampo de la rata	37
2.1. Resumen	37
2.2. Objetivos específicos	38
2.3. Materiales y métodos	38
2.3.1. Animales	38
2.3.2. Protocolo de BM	38

2.3.3 Inyección de adenovirus e inmunohistoquímica para GFP	39
2.3.4 Análisis histológico	39
2.3.5 Adquisición de imágenes y análisis de datos	40
2.3.6. Análisis estadístico	41
2.4. Resultados	41
2.4.1. Las ratas aprenden a realizar el test cognitivo pero se habitúan a los PTs	41
2.4.2. El entrenamiento de largo plazo en el BM incrementa la espinogénesis en neuronas de CA1 y GCL	43
2.5. Discusión	43
Capítulo 3. Estudios sobre el impacto del envejecimiento sobre la memoria y el hipocampo: Identificación de una impronta transcriptómica asociada con un ambiente inflamatorio en el hipocampo de ratas viejas	47
3.1. Resumen	47
3.2. Objetivos específicos	48
3.3. Materiales y métodos	48
3.3.1 Animales	48
3.3.2 Evaluación de memoria espacial: diseño experimental	48
3.3.3. Procesamiento de cerebros	49
3.3.4. Inmunohistoquímica	49
3.3.5 Recuento de neuroblastos, células microgliales y estimación del volumen en el hipocampo	50
3.3.6 Extracción de ARN, preparación de library y secuenciamiento	51
3.3.7. RT-qPCR	51
3.3.8. Análisis del secuenciamiento de ARN	52
3.3.9. Análisis comparativo de la impronta transcriptómica del envejecimiento en el hipocampo	53
3.3.10. Análisis estadístico	53
3.4. Resultados	54
3.4.1. Cambios en el aprendizaje y en la memoria espacial de las ratas asociados al envejecimiento.	54

3.4.2 Cambios morfométricos en el hipocampo dorsal relacionados al envejecimiento	55
3.4.3 Cambios de expresión génica en el hipocampo asociados al envejecimiento	57
3.5. Discusión	62
Capítulo 4. Estudios sobre terapia génica neuroprotectora a corto plazo con IGF-I en el hipocampo de la rata vieja	70
4.1. Resumen	70
4.2. Objetivo específico	70
4.3. Materiales y métodos	71
4.3.1 Vectores adenovirales	71
4.3.2 Animales	71
4.3.3. Diseño experimental	71
4.3.4. Cirugías estereotáxicas	71
4.3.5. Evaluación de memoria espacial	72
4.3.6. Procesamiento de cerebros	72
4.3.7. Inmunohistoquímica	73
4.3.8. Morfometría del hipocampo	73
4.3.9. Dosaje de IGF-I	74
4.3.10. Análisis estadístico	74
4.4. Resultados	74
4.4.1 Cambios cognitivos	74
4.4.2. Expresión de los transgenes IGF-I y DsRed	75
4.4.3. Cambios morfométricos en el hipocampo dorsal	76
4.5. Discusión	80
Capítulo 5. Estudios de terapia génica de largo plazo con IGF-I en el hipocampo de la rata senil y su implicancia en la modulación de genes relevantes para la memoria	85
5.1. Resumen	85
5.2. Objetivo específico	85

5.3. Materiales y métodos	86
5.3.1. Diseño experimental	86
5.3.2 Adenovectores HD	86
5.3.3 Inyecciones estereotáxicas	87
5.3.4. Análisis del secuenciamiento de ARN	87
5.3.5. Análisis estadístico	88
5.4. Resultados	88
5.4.1 Efectos de la terapia génica con IGF-I en la memoria espacial	88
5.4.2 Expresión de los transgenes IGF1 y DsRed	89
5.4.3 Genes hipocampales cuya expresión se modifica con la terapia génica con IGF-I en ratas viejas	90
5.4.4 Análisis de la microglia en el SR y el DH del hipocampo	93
5.4.5 Volumen del SR y el DH del hipocampo	94
5.5. Discusión	94
Capítulo 6. Construcción de vectores virales bicistronicos para IGF1 y genes marcadores	98
6.1. Resumen	98
6.2. Objetivo específico	98
6.3. Construcción de vectores lentivirales	98
6.4. Construcción de vectores adenovirales	103
6.4.1. Vectores adenovirales de primera generación (RAds)	103
6.4.2. Vectores adenovirales Helper dependent	106
Capítulo 7. Experimentos propuestos para el futuro: Desarrollo de un novedoso método de terapia celular para incrementar la neurogénesis hipocampal	108
7.1. Resumen.	108
7.2. Objetivos Específicos	109
7.3. Experimentos propuestos	109
7.3.1. Experimento 1: Reprogramación y trasplante de MEFs	110

7.3.2. Experimento 2: Reprogramación y trasplante de astrocitos	111
7.3.3. Experimento 3: Amplificación <i>ex vivo</i> de NSCs del DG y trasplante	111
7.4. Resultados esperados	112
Capítulo 8. Consideraciones finales y conclusiones	113
Bibliografía	116
Apéndice A. Métodos de biología molecular	135
Apéndice B. Fórmula de soluciones	139
Lista de figuras	141
Lista de tablas	143

Prólogo

Las Rab GTPasas son proteínas G que se expresan en el cerebro para regular el tráfico de membranas. L.G. era una estudiante de doctorado quien, hacia fines de año, estaba finalizando sus estudios (o el financiamiento para sus estudios la estaba finalizando a ella). La tesis de L.G. consistía en estudiar la interacción entre las Rab GTPasas y la α -Sinucleína, la principal proteína componente de los cuerpos de Lewy, depósitos proteinaceos característicos en cerebros post-mortem de pacientes con Enfermedad de Parkinson. Particularmente, sus estudios se acotaron a la proteína Rab7, para la cual L.G. disponía de un anticuerpo; pero su gran inconveniente fue no poder poner a punto el Western Blot para Rab7 hasta el mes de Octubre, cuando su contrato estaba agonizando. Con el entusiasmo propio del 'más vale tarde que nunca' L.G. se propuso hacer un experimento ambicioso, que podría no sólo salvar su doctorado, sino catapultarla hacia una publicación bastante original. Entonces lo hizo: un día tomó dos tipos de ratones C57 de distintas edades (13,26 y 39 semanas): ratones wt y ratones transgénicos 'Thy1-wt-syn' (los cuales sobreexpresan la α -sinucleína humana en cerebro). Entonces microdisectó muy hábilmente cuatro regiones del cerebro: corteza, hipocampo, cerebro medio y cuerpo estriado. Luego, L.G. congeló estas muestras a -80°C para extraer proteínas más adelante.

En diciembre, tuvo lugar el 'retreat' grupal, una jornada completa de presentaciones Power Point en donde cada uno de los estudiantes de doctorado mostró sus resultados. Era un momento clave en donde todos quedarían al descubierto, había que quedar bien con el jefe, había que poner toda la carne en el asador, era un todo o nada.

Cuando llegó el momento de L.G., ella desplegó durante 15 o 20 minutos una serie de resultados intrascendentes, como si se estuviera guardando lo mejor para el final. Hacia el final de la presentación, L.G. mostró el resultado del experimento con los ratones. Había hecho un trabajo de Western Blot notable: tomando como calles a la región cerebral para cada ratón (corteza, hipocampo, cerebro medio y cuerpo estriado), desplegó en cada calle seis proteínas distintas, en orden de PM decreciente: pro-catepsina D, catepsina D, GAPDH, Rab7, α Syn y β -actina. Todos los presentes se maravillaron, era un Western Blot perfecto, impecable, todos los presentes felicitaron a S.E., quien sonreía disfrutando ese momento que le había llegado tras tanto esfuerzo.

De repente, sucedió algo inolvidable: una post-doc no pudo con su genio y tuvo que abrir la boca. ¿Qué fue lo que dijo? Las imágenes estaban increíbles, pero había un pequeño detalle.

Para comparar cantidad de proteínas, se necesita que todas estén en el mismo gel, (y luego, en la misma membrana). Al haber usado un peine de 10 calles, a L.G. en cada gel le habían quedado dos ratones, con sus 4 regiones del cerebro correspondientes. Comparar sólo 2 ratones (uno wild type y uno transgénico) de una cierta edad carecía de sentido estadístico (era $N=1$ comparado con $N=1$). Debería haber utilizado un gel por región para cada edad, para así por lo menos comparar $N=4$ para cada edad. El silencio posterior a la crítica fue atroz. L.G. lo sabía, no tenía más tiempo para hacer experimentos, su contrato había finalizado y se tenía que mudar de ciudad. Había estado realmente muy cerca, pero no lo había logrado.

L.G. se doctoró medio año después, cuando ya vivía en otro sitio. A pesar de la belleza de esos Western Blot, esas imágenes carecían de valor científico y nunca se publicaron. L.G. había trabajado muy duro, pero su equivocación fue fatal y decidió no continuar con su carrera científica.

Abreviaturas

asf: fracción de muestreo de área (por sus siglas en inglés, 'area sampling fraction')

AD: Enfermedad de Alzheimer (por sus siglas en inglés, 'Alzheimer's disease')

AT: ensayo de adquisición (por sus siglas en inglés, 'acquisition trial')

BBB: barrera hematoencefálica (por sus siglas en inglés, 'blood-brain barrier')

CA: cuerno de Amón

CE: corteza entorrinal

DA: dopamina, dopaminérgico/a

DCX: doblecortina

DE: diferencialmente expresados

DG: Giro Dentado (por sus siglas en inglés, 'Dentate Gyrus')

DH: Hilio (por sus siglas en inglés, 'Dentate Hilus')

EE: ambiente enriquecido (por sus siglas en inglés, 'enriched environment')

ESTIMATE: algoritmo para calcular el componente inmune de un set de datos de transcriptoma (en inglés, 'Estimation of stromal and immune cells in malignant tumor using expression data').

icv: intracerebroventricular

GCL: capa granular de células (por sus siglas en inglés, 'granular cell layer')

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glia (por sus siglas en inglés, 'Glial fibrillary acidic protein')

GFP: proteína fluorescente verde (por sus siglas en inglés, 'Green Fluorescent Protein')

GO: gene ontology analysis

HDad: adenovirus 'Helper dependent'

HD: Enfermedad de Huntington (por sus siglas en inglés 'Huntington's disease')

ICQ: inmunocitoquímica

IHQ: inmunohistoquímica

IGF-I: Factor de Crecimiento Insulino Símil 1 (por sus siglas en inglés, 'Insulin Like Growth Factor I')

IGFBP: proteína transportadora de IGF (por sus siglas en inglés, 'IGF binding protein')

im: intramuscular

ip: intraperitoneal

ILPs: péptidos insulino similares (por sus siglas en inglés, 'Insuline like peptides')

LTP: long term potentiation (término muy usado en neurociencias, potenciación a largo término)

mCMVp: Promotor del Citomegalovirus murino (por sus siglas en inglés, 'murine Cytomegalovirus promoter')

MEFs: fibroblastos de embrión de ratón (por sus siglas en inglés, 'mouse embryonic fibroblasts')

NSC: célula stem neural (por sus siglas en inglés, 'neural stem cell')

PD: Enfermedad de Parkinson (por sus siglas en inglés 'Parkinson's disease')

pfu: unidades formadoras de placa (por sus siglas en inglés, plaque forming units)

PT: ensayo de prueba (por sus siglas en inglés, 'probe trial')

QNP= progenitores quiescentes neurales (por sus siglas en inglés 'Quiescent Neural Progenitors')

rAAV: vectores virales adeno-asociados (por sus siglas en inglés 'recombinant adeno-associated virus')

RA: adenovirus recombinante (por sus siglas en inglés, 'recombinant adenovirus')

RFP= Proteína fluorescente roja (por sus siglas en inglés 'Red Fluorescent Protein')

RGL= células similares a glia radial (por sus siglas en inglés 'radial glial like cells')

sc: subcutáneo/a

SD: Sprague Dawley

SGZ: Zona Subgranular (por sus siglas en inglés, 'Subgranular zone')

SNC: sistema nervioso central

SVZ: Zona Subventricular (por sus siglas en inglés, 'subventricular zone')

ssf: fracción de muestreo de secciones (por sus siglas en inglés, 'section sampling fraction')

Resumen

En humanos y ratas, el envejecimiento está asociado a un progresivo deterioro del aprendizaje y la memoria espacial. Además, el envejecimiento trae aparejado cambios morfométricos en el hipocampo, una estructura clave en la formación y consolidación de la memoria. Uno de estos cambios es una reducción dramática de la neurogénesis en la región del Giro Dentado. La rata senil presenta cambios similares al humano en la morfometría de su hipocampo y, además, tiene un desempeño inferior al de la rata joven en pruebas de memoria espacial; por lo tanto, es un excelente modelo de investigación básica para desarrollar terapias novedosas contra el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento.

Previamente en nuestro laboratorio se puso a punto la metodología del estudio de la memoria espacial en ratas mediante el Laberinto de Barnes. En este trabajo de tesis estudiamos en mayor profundidad el impacto que tienen protocolos de variada intensidad sobre la habituación comportamental en nuestra colonia de ratas y descubrimos que la memoria espacial puede ser evaluada hasta un máximo de tres veces, tiempo después del cual los sujetos se habitúan a la tarea. Además, luego de poner a punto la tinción de Golgi, descubrimos que el mero hecho de estar expuestas al test cognitivo por tres meses indujo en las ratas un incremento en la densidad de espinas dendríticas de neuronas del hipocampo.

Habiendo sentado las bases para el protocolo del Laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial en nuestra colonia de ratas, nos dispusimos a estudiar las diferencias comportamentales entre ratas jóvenes y seniles. Encontramos que las ratas seniles presentan un desempeño muy pobre en comparación con las jóvenes en el paradigma del Laberinto de Barnes. Luego nos preguntamos si este deterioro cognitivo tendría su correlato a nivel morfométrico y molecular en el hipocampo. En este sentido encontramos que el hipocampo senil presenta una dramática reducción en la tasa de neurogénesis, evaluada por inmunomarcación para Doblecortina. Además, encontramos una elevada infiltración de células microgliales en el hipocampo. En aras de investigar las vías biológicas del hipocampo asociadas al envejecimiento, realizamos secuenciamiento de ARN para análisis de expresión génica diferencial entre hipocampo joven y senil. Esto nos permitió descubrir que en el hipocampo senil están exacerbadas las vías de la respuesta inflamatoria, lo cual corroboró nuestra observación microscópica de infiltrados microgliales. Además, descubrimos una impronta transcriptómica conservada en humanos de 11 genes sobreexpresados en el hipocampo senil. Estos estarían implicados en una función biológica común que promueva

una reacción inflamatoria exacerbada en el envejecimiento. Este último hallazgo dio lugar a nuevas líneas de investigación en nuestro laboratorio, entre ellas el rol de la proteína Tyrobp en la respuesta microglial frente a fenómenos de envejecimiento cerebral y gliomas de diverso grado.

Los niveles cerebrales del Factor de Crecimiento Insulino Similar 1 (IGF-I) caen con el envejecimiento. Por lo tanto, el IGF-I emerge como una molécula neuroprotectora de especial interés para la implementación de terapia génica de sobreexpresión. Por lo tanto, para este trabajo realizamos dos estudios de terapia génica con IGF-I en ratas seniles: uno de corto y otro de largo plazo.

En nuestro experimento de corto plazo realizamos un protocolo corto de entrenamiento en el Laberinto de Barnes y encontramos que, dos semanas después de la terapia, ratas de 28 meses tuvieron mayor precisión de memoria espacial, así como un aumento en su recuento de neuronas inmaduras inmunomarcadas para Doblecortina en el hipocampo. Además, un análisis microscópico de células astrogiales inmunomarcadas para Proteína Glial Fibrilar Ácida nos permitió observar que la terapia estimuló un incremento en la arborescencia proximal en las prolongaciones de astrocitos hipocampales.

En nuestro experimento de terapia génica con IGF-I de largo plazo, realizamos sobre ratas de 24 meses un protocolo de test de comportamiento más extenso y observamos un rendimiento superior debido a la terapia cuando las ratas cumplieron 28 meses, lo cual sugiere que la efectividad de la terapia es mayor cuanto más avanzado está el envejecimiento. El análisis del transcriptoma reveló que la terapia génica estimuló la sobreexpresión de genes relacionados a actividad sináptica, a las vías de señalización del IGF-I y a la neurogénesis. Entre este último grupo de genes se encontró que la terapia génica indujo sobreexpresión de Doblecortina, lo cual respaldó nuestro experimento de corto plazo.

Este trabajo ha sentado las bases para evaluar la memoria espacial en ratas jóvenes y viejas mediante el Laberinto de Barnes, además hemos demostrado la efectividad de la terapia génica con IGF-I para tratar el déficit cognitivo relacionado a la edad. Por otra parte, se han generado nuevas líneas de investigación de acuerdo a nuestros hallazgos de cambios transcriptomales del hipocampo asociados al envejecimiento. Finalmente, se discuten para abordarse en el futuro terapias génicas con vectores bicistronicos codificantes para IGF-I y marcadores fluorescentes así como terapias celulares novedosas para mejorar el déficit cognitivo mediante las tecnologías de reprogramación celular seguidas de trasplante.

Capítulo 1. Introducción

Información compilada en este capítulo ha sido publicada en nuestro review en Current Gene Therapy.

Pardo J, Morel GR, Astiz M, Schwerdt JI, León ML, Rodríguez SS, Hereñú CB, Goya RG. Gene therapy and cell reprogramming for the aging brain: achievements and promise. Curr Gene Ther. 2014 Feb;14(1):24-34. Review.

1.1. Envejecimiento cerebral y el modelo de la rata senil

En Argentina, la población anciana se ha incrementado en las últimas décadas de una manera notable (**Fig 1**), reflejando lo que ocurre a nivel global.

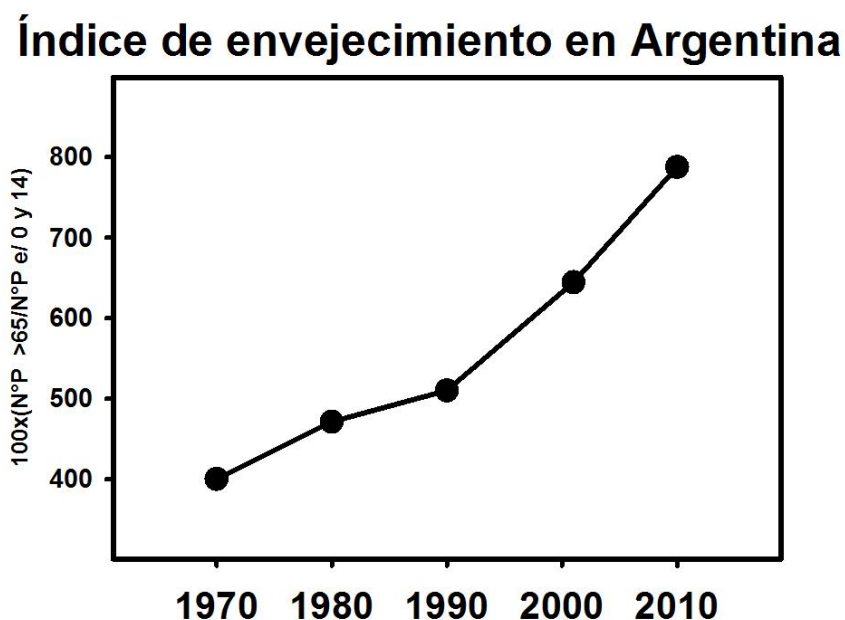


Figura 1. Índice de envejecimiento en Argentina. Datos obtenidos de los censos del INDEC. Nótese cómo el índice se ha duplicado en los últimos 40 años

El envejecimiento es el fenómeno ocasionado por el mero paso del tiempo en la vida de un ser vivo y es un flagelo que el hombre está muy motivado a vencer. La problemática del envejecimiento sobre la salud humana puede dividirse, arbitrariamente, en dos aspectos:

1) El envejecimiento constituye un factor de riesgo para numerosas enfermedades. Un reflejo de esto son las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, Alzheimer (AD) y Parkinson (PD). Estas patologías pueden desarrollarse a partir de una causa genética o esporádica, siendo la edad avanzada el principal factor de riesgo para la aparición esporádica.

2) El envejecimiento desencadena un progresivo deterioro de toda la economía corporal. Dicho fenómeno no se considera una patología sino una característica de la edad avanzada.

El envejecimiento cerebral ha sido ampliamente estudiado y algunas de sus bases se encuentran establecidas. Sin embargo, aún las preguntas superan a las respuestas, por lo cual actualmente continúan los esfuerzos para dilucidar tales interrogantes.

Se sabe que el cerebro viejo 'sano' no presenta una disminución significativa del número de células, así como de su volumen, no siendo así el caso de los cerebros que sufren de enfermedades neurodegenerativas, como en AD, PD y Enfermedad de Huntington (HD) [Gorman y col., 2008]. Sin embargo, claramente la función del cerebro senil muestra deficiencias cuando se compara con su contraparte joven. Posiblemente, las causas de tal deficiencia se encuentren a nivel de los cambios en las conexiones neuronales y/o cambios a nivel molecular, ya sea por alteraciones de expresión génica o epigenética.

Para nuestros estudios sobre envejecimiento cerebral, es preciso contar con un modelo animal que nos permita llevar a cabo experimentos de ciencia básica. En nuestro laboratorio, históricamente hemos utilizado como modelo de envejecimiento a la rata hembra senil. De esta manera, nuestra colonia exocriada de ratas SD fue fundada en la década del '80, siendo la fuente original de animales los del bioterio de la empresa Laboratorios Bagó, quienes generosamente nos donaron los planteles iniciales. En nuestro bioterio, la rata hembra senil vive típicamente hasta los 34-36 meses de edad y su vida reproductiva cesa a los 9-10 meses [Rodríguez y col., 2013]. El principal problema de salud que tienen estos animales al envejecer es el desarrollo de prolactinomas en su hipófisis, lo cual conlleva a niveles séricos elevados de prolactina y, en consecuencia, a la aparición de tumores mamarios [Hereñú y col., 2006].

1.2. Memoria espacial en ratas

La memoria es una materia de estudio sumamente interesante y compleja. Esta pequeña introducción pone en perspectiva el concepto de memoria dentro de las funciones cognitivas de orden superior. Posteriormente, especificaré el subtipo de memoria que se estudió para esta tesis: la memoria espacial. Luego, describiré al tests cognitivo para evaluar memoria espacial que hemos puesto a punto en nuestro laboratorio: el Test de Barnes.

El cerebro de los mamíferos tiene la capacidad de adquirir y almacenar información sumamente diversa a través de dos procesos cognitivos de alto orden: el aprendizaje y la memoria. No es el objetivo de esta tesis ahondar sobre definiciones; no obstante esto, es

necesario conocer ciertos conceptos básicos. El término cognición se aplica a procesos como el aprendizaje, la memoria, la asociación, el lenguaje, la atención, la formación de conceptos y resolución de problemas **[Kandel y col., 2000]**. Cuando uno de estos procesos falla en un individuo, decimos que este presenta un déficit cognitivo.

Por otra parte, entendemos por aprendizaje al proceso mediante el cual adquirimos conocimiento sobre el mundo y por memoria al proceso mediante el cual este conocimiento es codificado, almacenado y, más tarde, recuperado **[Kandel y col., 2000]**.

El fenómeno de habituación se refiere al proceso por el cual, ante un estímulo repetido, la respuesta es cada vez menos intensa. El proceso opuesto es la sensibilización, que consiste en el aumento de la respuesta ante un mismo estímulo **[Morgado Bernal y col., 2015; Tulving y col., 1972]**.

La memoria se puede agrupar de acuerdo a su duración, en memoria de corto y de largo plazo. La primera, también llamada memoria de trabajo, tiene lugar en el orden de segundos o minutos y funciona a nivel celular con las macromoléculas presentes en un momento dado. Por el contrario, la memoria de largo plazo es un proceso que requiere de la síntesis de proteínas y se manifiesta en el orden de horas, días o años **[Kandel y col., 2000]**.

La memoria presenta distintas etapas, entre las que se identifican la adquisición, la consolidación y la recuperación **[Tarpy y col., 2000]**. La adquisición o fase de aprendizaje ocurre cuando el individuo aprende la relación entre diversos estímulos o adquiere habilidades o destrezas necesarias para responder adecuadamente a diferentes estímulos. La consolidación se define como el proceso por el cual la memoria recién adquirida se hace estable y duradera en un intervalo temporal específico. La recuperación es la activación de la información previamente almacenada, lo que normalmente se denomina 'evocación'.

En la ventana temporal en la cual una memoria es recuperada, ésta puede ser modificada, es decir, es susceptible a interferencias o al olvido mientras es almacenada a largo plazo. El olvido es el proceso en el cual se pierde la capacidad de activar información previamente aprendida, simplemente porque esa información ha sido eliminada, por ejemplo cuando hay muerte de neuronas a causa de una enfermedad neurológica **[Tarpy y col., 2000]**.

Un individuo siempre adquiere nuevas memorias a través de la memoria a corto plazo, esta nueva información puede ser borrada o almacenada en el tiempo. Para que esto último ocurra la información se debe traspasar al sistema de almacenamiento a largo plazo.

Los roedores hacen uso del aprendizaje y memoria espacial en su vida silvestre, por ejemplo para buscar alimentos. En el laboratorio sacamos ventaja de este comportamiento natural para evaluar capacidad mnemónica. Uno de nuestras herramientas para esto es el uso

de laberintos, en donde los roedores deben poner en juego su capacidad cognitiva para orientarse en el espacio para un determinado fin, sea recompensarse con un alimento o escapar de un ambiente nocivo. Una estructura cerebral clave para la memoria espacial es el hipocampo. [O'Keefe y Nadel, 1978].

1.3. El hipocampo de la rata

1.3.1. Anatomía, función y su modificación en el envejecimiento

En la rata el hipocampo forma parte del sistema límbico y se ubica en el lóbulo temporal medial de la corteza cerebral. Dicha región presenta una gran plasticidad estructural y funcional, y está implicado en muchos procesos neuronales, en particular es de crítica importancia en el aprendizaje y en la formación de la memoria [Squire y col., 2004]. De la misma manera que sucede en otros circuitos corticales, la red del hipocampo es altamente dinámica y tiene la capacidad de modificar su conectividad cambiando el número y la fuerza de los contactos sinápticos dependiendo de su actividad [Bischofberger y col., 2008; Schinder y col., 2004]. Las conexiones sinápticas se pueden añadir, reforzar, debilitar, o eliminar en respuesta a la actividad neuronal, un fenómeno llamado plasticidad sináptica. La plasticidad de las sinapsis hipocámpales específicas tiene un papel significativo en la formación de la memoria y el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo [Nakazawa y col., 2004; Whitlock y col., 2006].

En la rata, el hipocampo se caracteriza por una estructura simétrica hacia ambos hemisferios cerebrales y en ella se pueden distinguir las siguientes dos zonas principales: el Giro Dentado (DG) y el cuerno de Amón (CA). En este último, a su vez, se distinguen tres regiones denominadas CA1, CA2, CA3 [Amaral y Lavenex, 2006].

La información fluye hacia y a lo largo de la formación hipocámpal por medio de tres vías principales:

La vía perforante que circula desde la corteza entorrinal (CE) a las células granulares del DG; la vía de las fibras de Musgosas, que circula desde las células granulares del DG a las células piramidales de la región CA3, y la vía colateral de Schaffer, que proyecta desde las células de la región CA3 a las de la región CA1.

El circuito de la formación hipocámpal se inicia en las neuronas de la capa II de la CE. Los axones de estas neuronas se proyectan hacia el DG a través de la vía perforante. Las células granulares del DG envían proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas y luego la información se transmite a las neuronas piramidales CA1 a través de la

vía colateral de Schaffer. Las neuronas piramidales CA1 envían sus axones al subículo y a la CE, desde donde la información cierra el circuito volviendo al hipocampo (**Fig 2**). El DG del hipocampo adulto tiene la capacidad adicional de modificar sus conexiones mediante la adición de nuevas neuronas. Por lo tanto, la remodelación de la red no se limita a las sinapsis, sino que también incluye la incorporación de nuevas unidades funcionales (neuronas) que proporcionan una dimensión adicional de plasticidad al circuito hipocampal existente [Schinder y col., 2004; Piatti y col., 2006].

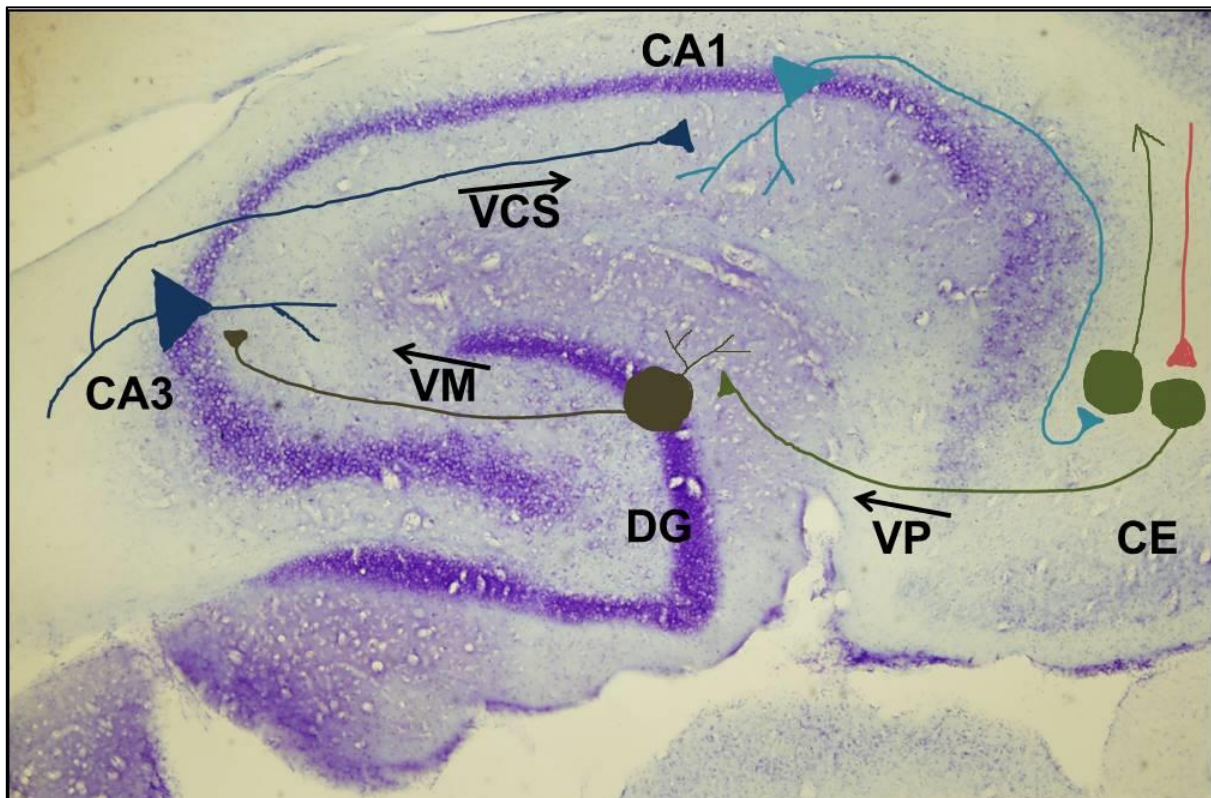


Figura 2. Esquema del circuito hipocampo-EC. El circuito se esquematiza en esta fotografía tomada de un corte sagital de cerebro de rata teñido con Nissl. CE= Corteza entorrinal. VP= Vía perforante. DG= Giro Dentado. VM= Vía muscosa. CA3= Cornu Ammonis 3. VCS= Vía Colateral de Schaffer. CA1= Cornu Ammonis 1.

Los primeros estudios del siglo 20 habían documentado una pérdida de las neuronas del hipocampo con la edad. Sin embargo, luego la utilización de métodos para contar células basados en la estereología no sesgada [West y col., 1993] mostraron que en principio no hay pérdida de las principales células en el hipocampo senil en rata [Rapp y col., 1996; Rasmussen y col., 1996], ratón [Calhoun y col., 1998], monos [West y col., 1999; Peters y col., 1996] y humanos [West y col., 1993]. No obstante esto, cabe destacar que en un estudio realizado por West y cols. en 1993, se observó una pérdida de las células del subículo y del hilio (DH, por sus siglas en inglés) del DG en humanos seniles [West y col., 1993]. Además,

en otros estudios se documentó que en la AD tiene lugar una pérdida neuronal en la región CA1 y CA3 del hipocampo [Chen y col., 2001; Padurariu y col., 2012].

En estudios en animales se observó que con el envejecimiento las neuronas piramidales de la región CA1 pierden contactos sinápticos desde la vía colateral de Schaffer y poseen alteraciones en la regulación del calcio, lo cual conduce a déficit cognitivo [Rosenzweig y col., 2003; Himeda y col., 2005; Thibault y col., 2001]. Además, se observó que en ratas viejas, hay una disminución en densidad sináptica, en el área de densidad post-sináptica y en el número total de sinapsis en la región del Stratum Radiatum (SR) [Li y col., 2009].

Finalmente, otro rasgo morfométrico interesante asociado al envejecimiento del hipocampo es una activación progresiva de la microglia, el efector inmune de inflamación y de reconocimiento de antígenos en el cerebro [Streit y cols., 2004].

1.3.2. Nicho neurogénico del Giro Dentado

El cerebro adulto posee dos nichos neurogénicos, la zona subgranular (SGZ) del DG hippocampal y las zonas subventriculares (SVZ, por sus siglas en inglés) de los ventrículos laterales [Altman y col., 1965]. Después de madurar, las neuronas 'recién nacidas' migran hacia la capa granular de células (GCL) del DG [Gonçalves y col., 2016]. Interesantemente, en el hipocampo de la rata senil se ha observado una merma dramática de la neurogénesis en el DG [Kuhn y col., 1996].

El nicho neurogénico del DG hippocampal ha sido caracterizado extensamente [Bonaguidi y col., 2011; Suh y col., 2007; Encinas y col., 2011]. En un estudio importante, utilizando bromodeoxiuridina (BrdU) e inmunohistoquímica (IHQ) contra el marcador de neuronas jóvenes Doblecortina (DCX) y el marcador de neuronas maduras NeuN, se revelaron los cambios en la neurogénesis que se dan en el DG con el envejecimiento. Específicamente, se observó que, por un lado, independientemente de la edad, las neuronas inmaduras expresan DCX por aproximadamente 12 días, sufriendo posteriormente de un aclaramiento progresivo de DCX; el 80% de las células que habían incorporado BrdU se convirtieron en DCX (+) y subsecuentemente en neuronas NeuN (+); y el 50% de las neuronas 'recién nacidas' sobrevivieron por al menos 5 meses. Por otro lado, ellos observaron que, con el envejecimiento, las neuronas 'recién nacidas' presentaban una migración lenta pero finalmente expresan NeuN y se incorporan eventualmente a la GCL. Por lo tanto, en este trabajo se demostró, en el hipocampo viejo, que la principal causa de la caída en la

neurogénesis no es la sobrevida celular, sino la disminuida tasa de división mitótica de las NSCs [Rao y col., 2005].

En un estudio más detallado se realizó un mapeo del destino de las NSCs. Se reveló entonces que, en roedores adultos, los progenitores neurales del DG, también llamados células similares a glia radial (RGLs) o progenitores quiescentes neurales (QNP), se dividen asimétricamente para dar lugar a progenitores neuronales y QNPs. Estos últimos, después de algunas divisiones celulares más, escapan del ciclo celular y se convierte en astrocitos. De esta manera, este interesante modelo sugiere que la merma en la neurogénesis característica del envejecimiento se debe a una depleción del pool de QNPs con el envejecimiento, lo cual fue bautizado en este trabajo como el modelo del “*disposable stem cell*”, el cual abarca y explica en mayor detalle las observaciones del trabajo de Rao y cols. descripto arriba [Encinas y col., 2011].

1.3.3. Transcriptoma del hipocampo de la rata senil

Existe una clara evidencia de que una constelación de cambios en la expresión génica impacta sobre el fenotipo del hipocampo viejo. Efectivamente, estudios de expresión génica en roedores viejos han documentado cambios significativos en genes hipocampales relacionados a la síntesis del colesterol, inflamación, factores de transcripción, neurogénesis y plasticidad sináptica [Blalock y col., 2003; Burger y col., 2007; Burger y col., 2008; Rowe y col., 2007; Verbitsky y col., 2004].

Hasta el momento, la mayoría de los estudios de transcriptómica relacionados al envejecimiento fueron llevados a cabo en roedores macho. En el único trabajo que conocemos sobre hembras [Sanguino y col., 2006], se secuenció al ARN de corteza e hipocampo de ratas macho y hembra de 3 meses (jóvenes) y 18 meses (viejas) de edad. En este estudio se encontró que el transcriptoma presentaba diferencias de acuerdo al sexo. De esta manera, todavía existe un gap en cuanto al conocimiento sobre la transcriptómica del envejecimiento y su relación con el sexo del animal.

En un estudio muy interesante en humanos se determinaron los perfiles de expresión génica en el hipocampo, corteza entorrinal, giro superior frontal y giro post-central de 55 individuos neurológicamente sanos de entre 20 y 99 años de edad [Berchtold y col., 2008]. Los resultados de este trabajo mostraron que efectivamente el humano sufre cambios sexualmente dimórficos en la expresión génica del cerebro a lo largo del envejecimiento. Se detectó en todas las regiones cerebrales estudiadas que los varones sufren más cambios que

las mujeres, lo cual sugiere que, con el envejecimiento, los cambios de transcriptoma de roedores también presenten diferencias relacionadas al sexo [Berchtold y col., 2008].

1.4. Laberinto de Barnes: una herramienta para el estudio de la memoria espacial en roedores

En la mayoría de los estudios en roedores, la memoria espacial se evalúa con el Laberinto de agua de Morris. Sin embargo, para el caso de las ratas viejas este test es desventajoso dado que es estresante y exigente para los animales, lo cual constituye una complicación para la evaluación de la memoria de estos animales. En efecto, en un estudio se observó que el estrés producido por sumergir a las ratas en el agua provoca aumentos considerables de corticosterona y corticotropina [Sternberg y col., 1992]. En este contexto, el BM es un test más adecuado para nuestros estudios en animales viejos.

Por otra parte, el Laberinto de Barnes (BM, por sus siglas en inglés) es un test cognitivo ampliamente utilizado para evaluar la memoria espacial en roedores. Este test fue desarrollado por la científica canadiense Carol Barnes en el año 1979 [Barnes, 1979].

A continuación se describe el protocolo básico utilizado en nuestro laboratorio, adaptado de una versión del BM publicada en el año 2011 [Vargas López y col., 2011], en el cual las ratas aprenden a encontrar la salida del BM y este aprendizaje mejora a medida que los sujetos realizan más ensayos.

El BM se realiza en una plataforma circular de acrílico de 122 cm de diámetro y elevada 108 cm del suelo, esta contiene 20 agujeros de 10 cm de diámetro a su alrededor, pero sólo uno de ellos está conectado a una caja de escape negra removible de 38,7 cm de largo x 12,1 cm de alto x 14,2 cm de ancho. Por otra parte, una cámara cilíndrica blanca opaca de 25 cm de diámetro y 20 cm de altura es utilizada como caja de salida, en donde las ratas se ubican al comienzo del ensayo. El agujero de escape, o agujero meta, se numera 0 para fines de representación gráfica, y los demás agujeros se numeran del 1 a 10 en el sentido de las agujas del reloj y del -1 al -9 en el sentido contrario. En las paredes se colocan pistas espaciales que en nuestro caso han sido figuras geométricas simples (**Fig. 3**).

Para promover que la rata ingrese a la caja de escape se generan dos estímulos aversivos: un ruido blanco de 90 dB y una luz blanca caliente de 500 W. El desempeño de las ratas se graba con una cámara ubicada a 110 cm arriba de la plataforma. Luego los videos se observan con el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>).

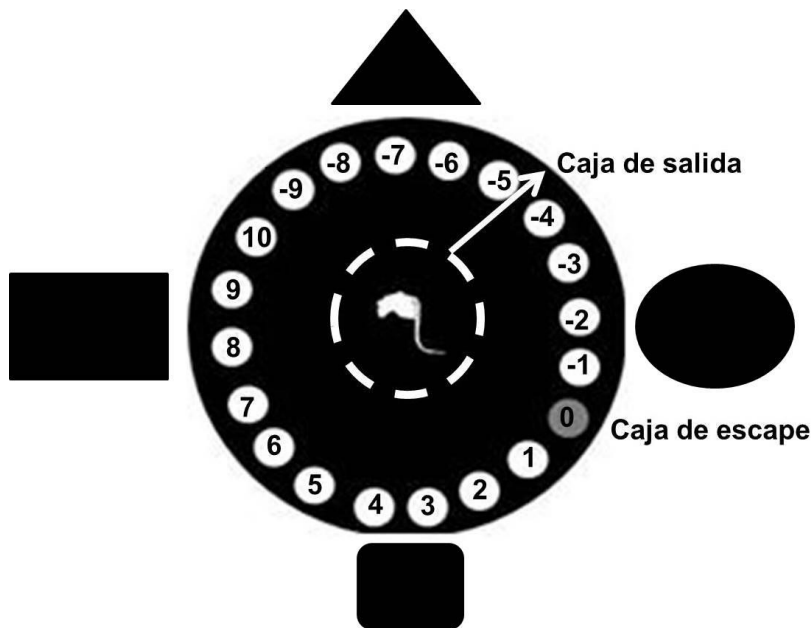


Figura 3. Representación de la plataforma del BM y las claves espaciales

El BM consiste en tres fases:

- **Habitación:** el día antes de realizar un experimento, las ratas se familiarizan a las cajas de salida y de escape.
- **Ensayo de aprendizaje, o adquisición (AT, por sus siglas en inglés 'acquisition trial'):** es un ensayo de tiempo variable en el cual la caja de escape está debajo del agujero meta. En algunas ocasiones, la rata explora el agujero meta pero no se introduce en él. Este ensayo termina cuando la rata se introduce en la caja de escape.
- **Ensayo de prueba (PT, por sus siglas en inglés 'probe trial'):** es un ensayo de tiempo variable en el cual la caja de escape no está debajo del agujero meta. Este ensayo, a diferencia del AT, termina cuando se acaba el tiempo.

Los parámetros de comportamiento analizados en el BM son típicamente los siguientes:

- **Exploraciones:** Se considera que una rata explora un agujero cuando desciende la totalidad de su hocico por debajo del plano de la plataforma. En un PT, la cantidad de exploraciones en el agujero meta indica directamente la memoria espacial de la rata. Cuantas más veces insista en explorar el agujero meta, por más que no esté la caja de escape debajo de este, nos indica que más fuerte es su recuerdo de que allí está la salida.
- **Latencia de escape:** se define como el tiempo (en segundos) que tarda el animal desde que es liberado de la caja de salida hasta que explora el agujero meta, ya sea en un AT o en un PT. Este es un parámetro de aprendizaje. Cuanto menor sea la latencia, significa que la rata habrá aprendido mejor dónde está ubicado el agujero meta.

- Errores: número de exploraciones en agujeros distintos al agujero meta. Este es un parámetro de aprendizaje. Cuanto menos numerosos sean los errores, significa que la rata habrá aprendido mejor dónde está ubicado el agujero meta.
- Distancia recorrida: es la distancia (en cm) recorrida por la rata durante un ensayo, ya sea AT o PT.

1.5. IGF-I como molécula neuroprotectora

1.5.1. Bioquímica del IGF-I

El gen del IGF-I pertenece a la superfamilia de la insulina. A partir de un evento de duplicación génica se generaron dos grupos de genes, uno constituido por insulina y factores de crecimiento insulino-símiles I y II (IGFs, por sus siglas en inglés) y el segundo grupo compuesto por las relaxinas y las hormonas similares a insulina. La insulina y los IGFs constituyen el grupo de péptidos insulino similares (ILPs, por sus siglas en inglés). Los ILPs son promiscuos para con sus receptores, reclutan cascadas de kinasas-fosfatasa y modulan la transcripción génica. En mamíferos hay 3 receptores de ILP: el de insulina, el de IGF-I (IGF-IR) y el de IGF-II. En esta introducción se mencionarán sólo algunos aspectos de la insulina y del IGF-II, mientras que se describirá con más detalle al IGF-I, haciendo foco en su acción en el cerebro.

Se sabe que la insulina circula libre en sangre, mientras que los IGFs circulan unidos a proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs, por sus siglas en inglés). En general, la insulina y los IGFs tienen una acción periférica en la cual regulan el metabolismo energético y el remodelado de tejidos. No obstante esto, en los últimos años se han descubierto otras funciones de estos péptidos en el cerebro [Wilkinson y cols., 2007; Sehat y cols., 2010; Garcia y cols., 1987; Bach y col., 2005].

Históricamente, la importancia clínica del IGF-I se ha relacionado con la deficiencia de este, cuya forma clásica es conocida como Síndrome de Laron, un tipo de enanismo [Laron y col., 2004]. Por otra parte, debido a su actividad mitogénica, la sobresecreción de IGF-I tiene un rol patogénico en ciertos tipos de cáncer [Moschos y Mantzoros, 2002].

En el hombre, y , de manera similar, en la rata, el IGF-I

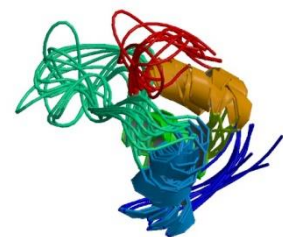


Figura 4. Estructura del IGF-I. Representación realizada por resonancia magnética nuclear. Código de acceso a la PDB: 2GF.

circulante es un péptido con un PM de 7649 Da (**Fig. 4**) y, tal como la insulina, posee dos cadenas A y B conectadas por 2 puentes disulfuro [**Rinderknech y col., 1978**]. El IGF-I se une, al menos, a 2 receptores celulares, el receptor de IGF-I (IGF-IR) y el receptor de insulina.

El IGF-IR es un heterotetrámero compuesto de 2 subunidades α extracelulares y 2 subunidades β transmembrana. Ambas subunidades α poseen sitios de unión al IGF-I y están conectadas por puentes disulfuro, mientras que las cadenas β poseen un dominio extracelular pequeño, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, el cual contiene un dominio tirosina kinasa responsable de la transducción de señales corriente abajo. Tal como sucede con el receptor de insulina, el IGF-IR sufre autofosforilación inducida por ligando [**Kato y col., 1994**].

El IGF-IR activado fosforila residuos de tirosina de otros sustratos, entre ellos sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y promueve la cascada enzimática vía fosfatidil-inositol-3 kinasa (PI3-kinasa), proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), la fosfotirosina fosfatasa Syp, la proteína Nck y la proteína de dominio homólogo a Src (Shc), la cual se asocia a Grb2 y activa a la kinasa Raf, llevando a la cascada de proteínas kinasas incluyendo a la kinasa activada por mitógenos (MAP), la kinasa 5 G y otros [**Le Roith y col., 1995**].

Como se muestra en la **Figura 5**, la activación de los receptores de ILPs desencadena en mayor o menor medida las mismas vías de señalización. Por lo tanto, la unión del IGF-II al IGF-IR tiene efectos similares a los del IGF-I en el cerebro [**Hawkes y col., 2004**].

Las vías canónicas desencadenadas por el receptor de insulina y el IGFR incluyen a la vías del PI3K-AKT-FOXO y RAS-MAPK, afectando en última instancia procesos celulares tales como síntesis de proteínas, autofagia, apoptosis y resistencia al estrés oxidativo. Además, se ha hallado al IGF-IR en el núcleo, lo cual sugiere que este pueda actuar directamente como un factor de transcripción. Respecto al IGF-IIR, se ha observado que sus acciones están mediadas por la protein kinasa C (PKC) y la fosfolipasa C [**Hawkes y cols., 2006**].

El IGF-I circulante media la actividad anabólica y mitogénica de la hormona de crecimiento (GH). Aunque el IGF-I se produce por muchos tejidos, en donde ejerce acción paracrina, la mayoría del IGF-I circulante es secretado por el hígado en respuesta a la GH [**Merimee y cols., 1996**].

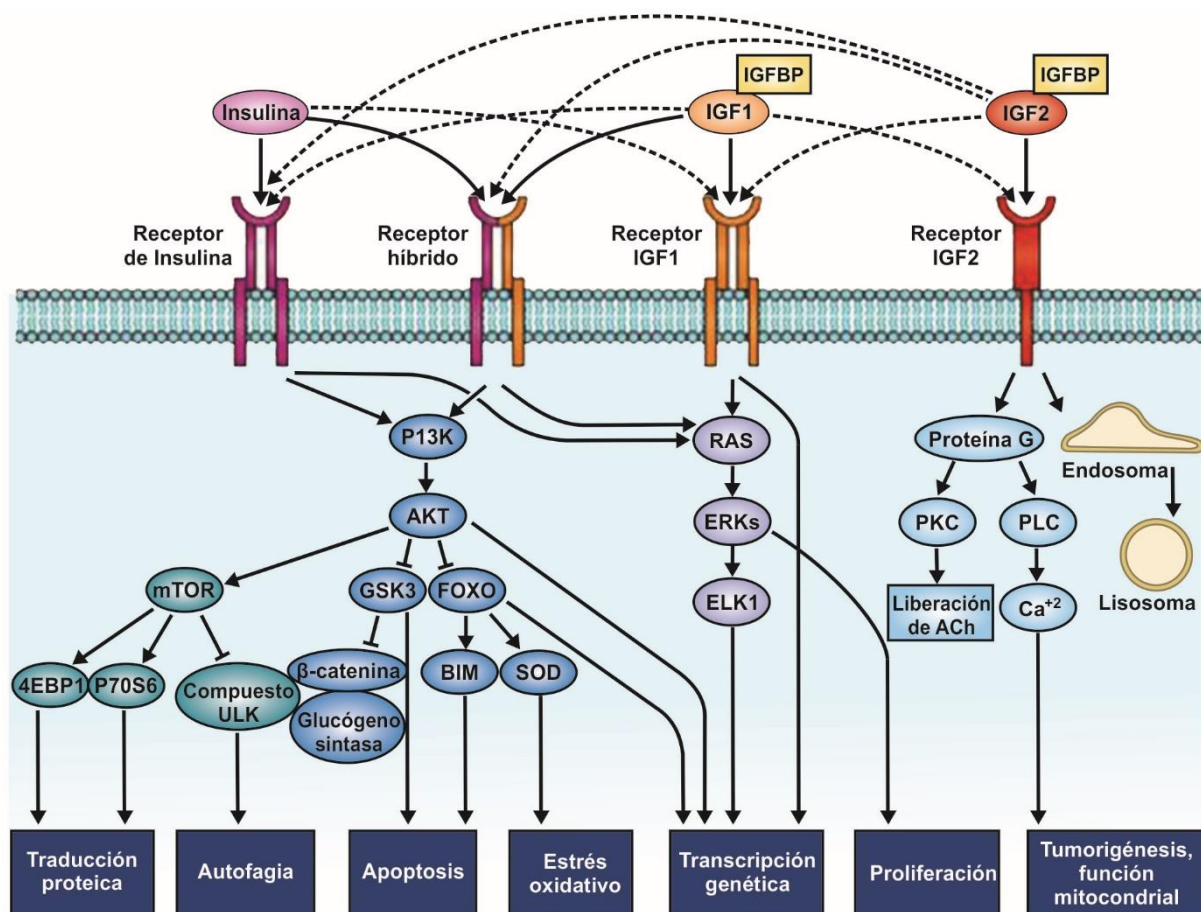


Figura 5. Vías de señalización de insulina, IGF-I e IGF-II. Imagen tomada de *Fernandez y col., 2012*.

1.5.2. Acción de proteínas insulino-símiles en el cerebro

Según se observó en roedores y humanos, durante el desarrollo embrionario los 3 ILPs se expresan en todos los tipos de linajes celulares neuroepiteliales del cerebro. Sin embargo esta síntesis se reduce drásticamente en el cerebro adulto [Cacicado y col., 1994; Ayer-le Lievre y col., 1991; Bach y col., 1991; Han y col., 1988; McKelvie y col., 1992; Pham y col., 1998; Sandberg y col., 1988]. La expresión de IGF-I alcanza su pico en el periodo perinatal, con un patrón difuso que abarca corteza, hipocampo, cerebelo, tallo cerebral, hipotálamo y médula espinal [Bach y col., 1991]. El mismo patrón se mantiene en el adulto, pero con niveles mucho más bajos [Bondy y col., 1991]. En el caso del IGF-II, se ha visto que se produce a altos niveles durante el desarrollo embrionario en los plexos coroideos y leptomeninges, pudiéndose también detectar en hipotálamo. No obstante esto, en la adultez el IGF-II se expresa altamente en plexos coroideos y meninges, pero además se expresa en el resto del cerebro [Stylianopoulou y col., 1988].

Interesantemente, se ha observado en el cerebro que en situaciones patológicas y de injuria, la microglia reactiva libera IGFs, siendo los astrocitos y las neuronas sus principales blancos, ya que sobreexpresan receptor de IGF-I luego del daño cerebral [Walter y col., 1997]. De esta manera, se ha sugerido la existencia de una acción cooperativa por parte de los IGFs provenientes de la glia para preservar el tejido neural. Esto estaría mediado por los niveles de IGFs y IGFBPs [Lee y col., 1996; Walter y col., 1997].

Existen 6 IGFBPs que unen IGFs, pero no insulina, con alta afinidad; además hay aproximadamente 10 proteínas relacionadas a IGFBP, las cuales unen IGFs con baja afinidad [Hwa y col., 1999]. Los 6 IGFBPs se expresan en el cerebro, siendo el IGFBP2 el más abundante [Ocrant y col., 1990]. Su principal rol es el de regular la biodisponibilidad de IGFs, ya que los IGFBPs unen IGFs con una afinidad mayor a los receptores de IGFs [Firth y col., 2002]. Los mecanismos que regulan la liberación de IGFs por parte de las IGFBPs son básicamente fosforilación y protección mediada por proteasas [Firth y col., 2002]. Excepto por el IGFBP4, todos los IGFBPs se expresan en más altos niveles en el cerebro embrionario que en el adulto, sin embargo su distribución anatómica se mantiene. Estos IGFBPs son producidos por vasos sanguíneos, epitelio de plexos coroideos, neuronas y células de la glia [Lee y col., 1993].

Cada uno de los 3 receptores de ILP se une a su ligando preferido con una afinidad de 100 a 1000 veces mayor respecto a los otros 2 ligandos. Interesantemente, el receptor de insulina forma híbridos funcionales con el IGF-IR. Por otra parte, el IGF-IIR no une insulina. La distribución de estos tres receptores en el cerebro es amplia y, al igual que ocurre con la expresión de los ILPs, la expresión de los receptores es mayor en el cerebro del embrión que en el del adulto [Devaskar y col., 1994; Hynes y col., 1988; Baron-Van y col., 1991]. Precisamente, antes de la formación del cerebro aparecen en la placa del piso ventral embrionaria los receptores de IGF-I [Bondy y col., 1990] y posteriormente en el desarrollo del cerebro estos receptores se localizan en la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el hipotálamo, el tallo cerebral y la médula espinal [Baron-Van y col., 1991]. En la adultez, estos receptores se expresan en neuronas residentes de las regiones mencionadas y en mayor medida en vasos sanguíneos y plexos coroideos [Bondy y col., 1991]. Similarmente, para el caso del IGF-II, sus receptores se expresan abundantemente en vasos sanguíneos y plexos coroideos durante el desarrollo embrionario y en el adulto se expresan en todo el cerebro, principalmente en neuronas de corteza e hipotálamo, en células epiteliales de plexos coroideos y epéndimo, y en vasos sanguíneos [Valentino y col., 1990].

1.5.3. Acción neuroprotectora del IGF-I

Si bien todos los tejidos producen IGFs, el hígado produce los IGFs periféricos con acción endocrina. En el cerebro adulto se ha encontrado que el ARNm para IGF-I se produce en bajos niveles, lo cual no es el caso del IGF-IR, el cual tiene una amplia expresión. Esto ha dado lugar a la hipótesis de que el IGF-I periférico entra al cerebro, cuyo mecanismo ha sido estudiado por el grupo del Dr. Torres Alemán, del Instituto Cajal en Madrid [Carro y col., 2000; Trejo y col., 2001; Nishijima y col., 2010].

Como se ha mencionado previamente, las células epiteliales de los plexos coroideos y de los vasos que forman la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) expresan en grandes cantidades receptores de ILPs, lo cual da lugar a un mecanismo de transcitosis a partir de estas barreras, en el cual los IGFs acceden al parénquima cerebral a través de la BBB o al LCR a través de los plexos coroideos.

Se ha observado que al aumentar los niveles séricos de IGF-I, también aumentan sus niveles en LCR, lo cual sugiere que el pasaje de IGF-I desde la sangre al LCR es constitutivo. Una vez en el LCR, el IGF-I difunde a áreas periventriculares, como el hipotálamo y el hipocampo. Sin embargo, el IGF-I puede llegar a áreas más profundas del cerebro sólo mediante mecanismos de transporte (unido a IGFBPs).

En un experimento muy interesante, se observó que al administrar IGF-I en el LCR se impide que el IGF-I endógeno ingrese al cerebro desde la sangre. Además, se observó que al administrar IGF-I marcado con digoxina en el LCR o en la sangre por inyección intracarótida, se marcan las mismas regiones del cerebro. En el mismo trabajo, se observó que la administración de IGF-I (por cualquier vía) marcaba a las neuronas piramidales del hipocampo y activaba a las células del DG, evidenciado por inmunomarcación con c-fos. De esta manera, en este trabajo se concluyó que la principal vía de acceso del IGF-I al cerebro es por la barrera sangre-LCR. Interesantemente, después de la inyección intracarotídea o el ejercicio, los niveles de IGF-I no se mantienen aumentados en sangre, sino en sus órganos blanco, por ejemplo el cerebro [Fernandez y col., 1998].

Existe una clara evidencia que el IGF-I juega un rol fisiológico en la neuroprotección. Como se mencionó previamente, su expresión se induce intensamente en el sistema nervioso central (SNC) después de diversos insultos tales como isquemia cerebral [Beilharz y col., 1998], injuria cortical [Li y col., 1998; Walter y col., 1997] y lesiones en la médula espinal [Yao y col., 1995]. Asimismo, en situaciones que involucran daño citotóxico en el hipocampo, la microglia de esta región incrementa dramáticamente la producción de IGF-I y

Proteína de Unión a IGF-I 2 (IGF-IBP2, por sus siglas en inglés), lo que sugiere un rol neuroprotector de estas moléculas en el CNS [Breese y col., 1996]. Además, se ha demostrado que el efecto neuroprotector del ejercicio físico está mediado, al menos en parte, por el IGF-I circulante [Fernandez y col., 1998]. Por otra parte, estudios *in vitro* demostraron que el IGF-I incrementa la sobrevivencia celular en cultivos primarios de células hipotalámicas [Torres Aleman y col., 1990] y estimula la diferenciación de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas [Knusel y col., 1990]. Además, se ha informado un efecto protector del IGF-I en células hipotalámicas inmortalizadas expuestas a agentes oxidantes [Sortino y col., 1996], en células DA humanas expuestas a la toxina salsolinol [Shavali y col., 2003] y en cultivos neuronales humanos y murinos expuestos a dosis tóxicas de DA [Offen y col., 2001].

La infusión directa de IGF-I se ha usado para proteger distintas regiones del cerebro. Por ejemplo, estudios en ratas lesionadas con el neurotóxico 6 hidroxidopamina (6 OHDA) sugieren que el IGF-I media el efecto neuroprotector de los estrógenos en neuronas dopaminérgicas nigrales [Quesada y col., 2004]. En un modelo de ataxia cerebelar en rata inducida por 3-acetilpiridina (AC), la administración subcutánea (sc) o intracerebroventricular (icv) de IGF-I restauró la coordinación motora y rescató parcialmente a las neuronas de la oliva inferior del efecto tóxico de AC [Fernandez y col., 1998]. Por otra parte, la infusión continua de IGF-I en ventrículo lateral restauró parcialmente las memorias de referencia y de trabajo en ratas macho de 32 meses, en comparación con su contraparte de 4 meses [Markowska y col., 1998]. Además, se ha informado que el IGF-I protege a las neuronas del hipocampo de los efectos tóxicos de péptidos amiloides [Dore y col., 1997] y que reduce la carga de péptido A β amiloide en ratones transgénicos que sobreexpresan un gen mutado para el mismo [Carro y col., 2006]. En otro estudio, células progenitoras neurales humanas (hNPC) que sobreexpresaban IGF-I fueron transplantadas a ratas 7 días antes de someterlas a inyección nigral de 6-OHDA. Interesantemente, el tratamiento redujo la asimetría rotacional y la pérdida de neuronas dopaminérgicas [Ebert y col., 2008]. Por otra parte, otro trabajo demostró que la inyección sc de IGF-I acoplado a polietilenglicol aumentó la sobrevivencia, la fuerza muscular y la coordinación motora en ratones mutantes *pmn*, un modelo con degeneración de las neuronas motoras [Jablonka y col., 2011].

1.6. Terapia génica neuroprotectora y vectores virales

1.6.1. Generalidades

La terapia génica puede definirse como la transferencia de material genético con fines terapéuticos. Alternativamente se la puede definir como el tratamiento de enfermedades, hereditarias o adquiridas, mediante la transferencia *in vivo* de polinucleótidos que alteran la expresión de proteínas específicas resultando en un beneficio terapéutico [Dubé y col., 1995; Basarkar y col., 2007]. Este objetivo puede lograrse, típicamente, mediante la producción de una proteína o ARNm para reemplazar o suplementar el producto de un gen que está ausente o defectuoso [Dubé y col., 1995]. La terapia génica ofrece ventajas únicas para la transferencia de largo plazo de factores neurotróficos, tales como el IGF-I, a regiones específicas del SNC. Existen vehículos de transferencia génica no virales, tales como ADN y ARN 'desnudos', liposomas y nanopartículas, los cuales permiten llevar una gran carga de material genético y son menos costosos que las partículas virales; sin embargo sólo permiten obtener una baja expresión génica y durante tiempos cortos [Bergen y col., 2008]. Por otra parte, se han diseñado un gran número de virus modificados genéticamente, los cuales permiten una eficiente expresión génica en las células huésped diana. Los vectores virales más comúnmente utilizados son adenovirus recombinantes, adenovirus 'Helper dependent', virus adeno-asociados, lentivirus, retrovirus y herpes virus recombinantes. Con estos vectores es posible obtener una alta expresión transgénica durante tiempos prolongados [Simonato y col., 2013].

1.6.2. Terapia génica con IGF-I

La terapia génica con IGF-I ha demostrado resultados promisorios en el cerebro de ratas viejas. En efecto, en nuestro laboratorio, un adenovirus recombinante (RAd-IGF-I) portador del gen para el IGF-I de rata fue utilizado para implementar terapia génica en el hipotálamo de ratas hembra seniles, las cuales presentan neurodegeneración en sus neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas y, como consecuencia, hiperprolactinemia crónica. La terapia restauradora con IGF-I fue implementada en ratas hembra jóvenes (5 meses) y seniles (28 meses), las cuales recibieron una única inyección intrahipotalámica de RAd-βgal (un adenovirus control que expresa la β-galactosidasa) o RAd-IGF-I y fueron sacrificadas a los 17 días post-inyección. En los animales jóvenes ninguno de los vectores modificó los niveles de

prolactina sérica pero en las ratas seniles inyectadas con RAd-IGF-I se observó una reversión prácticamente completa de su hiperprolactinemia. Los resultados morfométricos revelaron un incremento significativo del número de células tirosina hidroxilasa (TH) inmunoreactivas en el hipotálamo de los animales tratados, en comparación con los controles **[Hereñú y col., 2007]**. Estos resultados sugieren que el IGF-I podría tener una acción neurogénica en la población hipotalámica dopaminérgica en las ratas seniles. Interesantemente, la terapia génica no modificó la población dopaminérgica hipotalámica en las ratas jóvenes.

En otro estudio de nuestro laboratorio, se demostró que la ruta endimaria es una estrategia efectiva para incrementar los niveles de IGF-I en el LCR **[Hereñú y col., 2009]**. Tomando ventaja de esto, en un trabajo en el mismo modelo animal mencionado arriba, la terapia génica icv con IGF-I mejoró la performance motora en animales seniles **[Nishida y col., 2011]**. Aquí se observó que la terapia génica icv con IGF-I tuvo un impacto beneficioso en el desempeño motor de ratas seniles de 30-31 meses, las cuales suelen presentar un severo deterioro en tal desempeño. En este estudio, se inyectaron RAds que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) o IGF-I, lo que produjo una alta expresión del transgen correspondiente en células endimarias del cerebro y de la médula espinal. Diecisiete días después de la terapia génica, los animales seniles experimentales mostraron una significativa mejora en su performance en tests motores, lo cual no se observó para el caso de las ratas jóvenes **[Nishida y col., 2011]**.

En otro trabajo de nuestro laboratorio, se estudió el impacto de la terapia génica con IGF-I sobre el eje hipotalámico-ovárico en ratas de mediana edad reproductivamente competentes **[Rodriguez y col., 2013]**. En las ratas, la falla ovárica asociada al envejecimiento está precedida por una capacidad de respuesta anormal del eje neuroendocrino y feedback positivo de estrógenos **[Neal-Perry y col., 2010]**. Por lo tanto, se implementó terapia génica de largo plazo con IGF-I en el hipotálamo medio basal (MBH, por sus siglas en ingles) de ratas hembra de mediana edad. Para este fin, se utilizaron vectores virales adeno-asociados (rAAV) portadores del gen de la proteína fluorescente roja (DsRed), como control y del IGF-I-ires-DsRed, como gen terapéutico. La mayoría de las ratas tratadas con el vector que expresa IGF-I tuvieron ciclos estrales mejor preservados, así como una histología ovárica generalmente normal, mientras que el grupo control tuvo un mayor porcentaje de ratas acíclicas y, al final del estudio, estas mostraron ovarios con numerosos quistes y escasos cuerpos lúteos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de IGF-I en el MBH de ratas de mediana edad prolonga la función ovárica **[Rodriguez y col., 2013]**.

1.7.Terapia celular neuroprotectora

Además de la terapia génica, una estrategia que ha surgido con ímpetu en la última década es la terapia celular para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y para el envejecimiento *per se*. El descubrimiento en 2006 de que la transferencia de un número limitado de genes inductores de pluripotencia en células somáticas adultas puede reprogramarlas, llevándolas al estadio de células madre pluripotentes inducidas o iPSC [Takahashi y col., 2006], abrió un insospechado horizonte de posibilidades para el desarrollo de la medicina regenerativa personalizada, ya que estas iPSCs son susceptibles de diferenciarse hacia cualquier linaje celular, por ejemplo neuronas. Poco tiempo después se desarrollaron estrategias para reprogramar directamente células somáticas a neuronas, es decir sin pasar por un intermediario pluripotente [Berninger y col., 2007; Heinrich y col., 2010; Aravantinou-Fatorou y col., 2015; Ladewig y col., 2012]. La posibilidad de realizar terapia celular con células reprogramadas a partir de células somáticas de un individuo ofrece dos ventajas sobre la terapia celular basada en el uso de células madre embrionarias (la vedette de los años 90' para implementar terapia celular). La primera es de naturaleza ética ya que el uso de células reprogramadas para terapia celular no requiere de la destrucción de los embriones, desde donde hasta el momento se solían obtener las células madre. La segunda está asociada al hecho de que las células reprogramadas serían autólogas para ese paciente.

Para trasplantar neuronas inducidas '*bona fide*', las mejores candidatas serían aquellas reprogramadas a partir de células autólogas de un mismo individuo, ya que no habría rechazo immune. La conversión directa de células somáticas a neuronas se logró por primera vez hace una década [Berninger y col., 2007].

Desde entonces, una gran cantidad de laboratorios han implementado esta tecnología. En un trabajo muy interesante, el grupo del Dr. Benedikt Berninger utilizó un vector retroviral codificante para Neurogenina 2 (Neurog2) para reprogramar *in vitro* astrogliia postnatal cortical a neuronas glutamatérgicas, las cuales fueron capaces de formar sinapsis [Heinrich y col., 2010]. De esta manera, la expresión forzada de Neurog2 emerge como una tecnología robusta para reprogramar tipos celulares de diversos linajes dentro y fuera del SNC [Aravantinou-Fatorou y col., 2015; Ladewig y col., 2012].

Notablemente, el trasplante de células ha sido implementado exitosamente en algunos trabajos. De esta manera, fibroblastos de rata fueron reprogramados a neuronas dopaminérgicas y estas fueron trasplantadas al cuerpo estriado en un modelo de rata con PD [Del'Anno y col., 2014]. Además, en un estudio reciente, fibroblastos de embrión de ratón

(MEFs, por sus siglas en inglés) fueron reprogramados a neuronas GABAérgicas inducidas y estas fueron trasplantadas al hipocampo de un ratón adulto, en donde mostraron ser funcionales **[Colasante y col., 2015]**. Interessantemente, en otro trabajo, NSCs aisladas de la SVZ de rata fueron transducidas por un retrovirus codificante para Neurog2 y trasplantadas al DG de una rata adulta. Una vez dentro de la GCL del animal, se observó que estas células no expresaron una proteína marcadora de neuronas de la GCL llamada Prox1 (Prospero Homeobox 1). Sin embargo, cuando se utilizó una estrategia similar pero con NSCs aisladas del DG de una rata adulta, se observó que estas células sí expresaron Prox1 **[Chen y col., 2012]**.

Capítulo 2. Estudios sobre el impacto del Laberinto de Barnes en el hipocampo de la rata

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Neuroreport*.

Uriarte M, Ogundele OM, Pardo J. Long-lasting training in the Barnes maze prompts hippocampal spinogenesis and habituation in rats. *Neuroreport*. 2017 Apr 12;28(6):307-312.



2.1. Resumen

A pesar del amplio uso del BM hay aspectos que al momento de llevar a cabo nuestros estudios eran desconocidos pero relevantes para la correcta realización del test. Uno de ellos fue determinar a cuántos PT puede someterse a las ratas que realizan un largo protocolo experimental en el BM. Es decir, si existe límite de PTs, a partir del cual las ratas se dan cuenta que no está la caja de escape y por lo tanto no tiene sentido que exploren el agujero meta. El otro aspecto interesante a evaluar fue si la propia realización del BM tendría alguna repercusión sobre las neuronas del hipocampo de los animales. En relación con esto, se sabe que ratas expuestas a un ambiente enriquecido (EE, por sus siglas en inglés) presentan un desarrollo notable de espinas dendríticas en sus neuronas del hipocampo [Bergami y col., 2015].

Más aún, se ha demostrado que el EE promueve la plasticidad neuronal [van Praag y col., 2000], la neurogénesis hipocampal en el DG [Kempermann y col., 1999] e incrementa la densidad de espinas dendríticas en la corteza occipital [Globus y col., 1973]. En otro estudio, mediante inyección ip con estreptozotocina se disminuyó la densidad de espinas dendríticas e, interesantemente, el EE pudo restaurar este daño [Beauquis y col., 2010]. Si bien el BM es distinto al EE, hipotetizamos que un entrenamiento de largo plazo en el BM podría tener un efecto similar sobre la espinogénesis hipocampal al observado por el EE.

Con el fin de contestar estos interrogantes, ratas adultas SD fueron sometidas a un intenso entrenamiento de 3 meses en el BM. Luego, se estudió la habituación de los animales y la densidad de espinas dendríticas de dos poblaciones de neuronas hipocampales cuya función está asociada a la memoria espacial: CA1 y GCL [Goodrich y col., 2008]. Para esto último fue necesario poner a punto la tinción de Golgi Colonnier (impregnación argéntica).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Evaluar la posible habituación de las ratas en su desempeño en el Laberinto de Barnes.

2.2.2. Poner a punto la tinción de Golgi Colonnier.

2.2.3. Evaluar el efecto del BM sobre la espinogénesis en neuronas de CA1 y de la GCL en el DG del hipocampo mediante la técnica de Golgi.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Animales

Para los experimentos de esta tesis se utilizaron ratas hembra de la cepa SD. Estas fueron obtenidas de nuestra colonia de ratas del INIBIOLP. Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 hs con comida y agua disponible *ad libitum*. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías de bienestar animal del NIH. La aceptabilidad ética de nuestros protocolos animales fue aprobada por nuestro CICUAL de la Facultad de Cs Médicas, Universidad Nacional de La Plata (protocolo # T09-01-2013).

Para este trabajo se utilizaron 12 ratas hembra SD de 3 meses, las cuales pesaron 199 ± 1 g. Un grupo de 4 ratas fueron control naive (las cuales no conocen otro ambiente más que la caja donde viven), mientras que un grupo de 8 ratas fueron entrenadas en el BM por 3 meses. Tres animales por grupo se utilizaron para determinar densidad de espinas dendríticas con la técnica de Golgi Colonnier. En uno de los animales naive se inyectó un RAd-GFP, codificante para la GFP, en aras de observar la morfología de neuronas de las regiones CA1 y GCL y comparar estas con aquellas teñidas por impregnación argéntica.

2.3.2 Protocolo de BM

Al día 0 los animales fueron habituados a la caja de salida y escape colocándose por 180 s en cada una de ellas. El diseño fue organizado en 3 sesiones separadas por un intervalo de un mes. Cada sesión consistió en 9 días con 4 ATs por día. Debido a que la 1era sesión fue el encuentro original de los animales con el laberinto, se decidió darles un periodo largo de aprendizaje (9 días) y se los sometió al 1er PT al último día de la sesión 1 (día 9). Para las 2da y 3era sesiones, se realizó un PT cada 3 días (**Fig 6A**). En cada PT se evaluó la memoria

espacial como cantidad de exploraciones en el agujero meta. De esta manera, los animales fueron sometidos a un entrenamiento intenso en la 1era sesión de aprendizaje y luego su memoria espacial fue evaluada con varios PTs para averiguar a partir de cuál PT las ratas se habitúan a la prueba y ya no es posible evaluar memoria espacial. Para el análisis estadístico, latencia y errores fueron promediados para los 4 ATs de cada día experimental.

2.3.3 Inyección de adenovirus e inmunohistoquímica para GFP

Para observar la morfología de neuronas residentes en las regiones CA1 y GCL, realizamos una inyección estereotáxica intrahipocampal de RAd-GFP. Este vector fue construido con el procedimiento descrito previamente en nuestro laboratorio [Hereñú y col., 2009]. El ADNc de la GFP fue colocado bajo el control del promotor del Citomegalovirus murino (mCMV, por sus siglas en inglés). El adenovector fue rescatado de lisados de células HEK293 y purificado por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. El título del stock adenoviral fue calculado por el método de la dilución múltiple de placas de lisis [Hereñú y col., 2009].

El día experimental 0, los animales recibieron 10^9 unidades formadoras de placas (pfu, por sus siglas en inglés) del RAd-GFP en 2 μ l bilateralmente en las siguientes coordenadas relativas al bregma: AP: -3,8; L: $\pm 2,7$; DV: -2,7 y -3,5 para regiones CA1 y GCL, respectivamente [Paxinos & Watson, 1998]. Dos días después de la inyección estereotáxica del RAd-GFP la rata fue anestesiada y perfundida y su cerebro fue procesado para IHQ. La IHQ se realizó con el método de 'cortes en flotación' sobre cortes coronales de 60 μ m. Las secciones se incubaron con un anticuerpo primario anti-GFP hecho en conejo (1:10000, Invitrogen #A6455), toda la noche a 4°C. Luego, fueron incubados con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1:300 BA-1000) por 2 hs y con complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:500, PK-6100, Vector ABC Elite Kit) por 90 minutos. Finalmente, la IHQ se reveló con cloruro de 3, 3'-diaminobencidina (DAB). Las secciones fueron montadas en vidrios gelatinizados y cubiertas con Bálsamo de Canadá.

2.3.4 Análisis histológico

Tinción de Golgi Colonnier. Los animales se perfundieron por vía transcardíaca con 200 ml de PBS seguido de 200 ml formol al 4% en PBS. Luego, el cerebro fue post-fijado por 24 hs en formol al 4% en PBS. Subsecuentemente, se utilizó una versión modificada de la técnica de Golgi Colonnier para teñir neuronas de las regiones CA1 y GCL [DeFelipe & Fairén, 1988]. Brevemente, los cerebros post-fijados fueron cortados en secciones coronales de 5 mm

de espesor conteniendo al hipocampo. El tejido fue incubado en oscuridad en las siguientes soluciones preparadas en agua destilada: dicromato de potasio 2,5%, glutaraldehído 5% por 5 días; dicromato de potasio 3,5% por un día; nitrato de plata 2% por un día; dicromato de potasio 3,5 % por 3 días; nitrato de plata por un día y sacarosa 30% por un día.

Luego, las secciones de 5 mm fueron cortadas en un vibrátomo para obtener secciones coronales de 200 μ m. Luego, las secciones fueron gradualmente deshidratadas en el siguiente orden: etanol 70%, etanol 100% y xileno. Finalmente, las secciones fueron montadas en vidrios gelatinizados y cubiertas con Bálsamo de Canadá. Este método se puso a punto en el laboratorio y permitió obtener una impregnación argéntica estocástica en neuronas, por medio de la cual se pudieron distinguir las espinas dendríticas a alto aumento microscópico.

2.3.5 Adquisición de imágenes y análisis de datos

Las imágenes de expresión de GFP fueron adquiridas con un microscopio Olympus BX-51 conectado a una videocámara CCD Olympus DP70 (Tokio, Japón). Las imágenes de Golgi-Colonnier fueron adquiridas con el mismo microscopio, aunque algunas imágenes panorámicas también se obtuvieron con un Hamatsu Nanozoomer (Hamatsu Photonics, Japón), en el laboratorio de nuestro colaborador Dr. Olalekan Michael Ogundele (Comparative Biomedical Sciences, Louisiana State University, School of Veterinary Medicine Baton Rouge, LA-USA). Las imágenes calibradas de las dendritas fueron tomadas a un aumento de 1000X. Luego, se hizo zoom sobre las espinas dendríticas, las cuales fueron identificadas y contadas ciegamente de forma manual en el software Image Pro Plus v5.1 software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Para este estudio, se determinó la densidad de espinas de dendritas de neuronas de la GCL y piramidales de CA1. Nuestra decisión de enfocarnos en estas regiones del hipocampo se debe a que son anatómicamente de fácil identificación y a que se han observado afectadas en enfermedades neurodegenerativas y en estudios en ratas viejas. Ciertamente, CA1 y SR son zonas particularmente vulnerables a la degeneración en pacientes de AD [West y col., 1994; Price y col., 2001] . Además, en ratas viejas se ha observado que en el SR hay una disminución en la densidad sináptica, del área de densidad post-sináptica y en el número total de sinapsis [Li y col., 2009].

La densidad de espinas fue medida según criterios descritos en tRabajos de otros grupos [Beauquis y col., 2010; Trinchero y col., 2015]. Brevemente, en el estudio de espinogénesis en neuronas de CA1 se analizaron las dendritas apicales orientadas hacia el SR, para ello se identificaron 10 neuronas por animal en las cuales se analizaron segmentos de dendritas de al

menos 20 μm de longitud [Beauquis y cols., 2010] y, con el ajuste micrométrico de nuestro microscopio, se observaron a lo largo de todo el espesor del preparado. Para el caso de las neuronas de la GCL, el conteo de espinas se realizó en el tercio medio de la capa molecular. Se consideraron 10 neuronas por animal y se calculó la densidad de espinas en segmentos de al menos 40 μm de longitud [Trincheri y cols., 2015]. Para ambos casos se calculó la densidad de espinas como la cantidad de espinas cada 10 μm de dendrita.

2.3.6. Análisis estadístico

Los parámetros de comportamiento fueron analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía de medidas repetidas (RM) con la corrección de Greenhouser-Geisser y el test post-hoc de Dunnet para comparaciones múltiples versus un control. Las comparaciones de las medias de densidad de espinas dendríticas fueron realizadas con un test-t no pareado. Todos los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados con el Software Graphpad Prism v6. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

2.4. Resultados

2.4.1. Las ratas aprenden a realizar el test cognitivo pero se habitúan a los PTs

Para este trabajo se implementó un protocolo de entrenamiento en el BM de largo plazo (Fig 6A).

La latencia y los errores disminuyeron drásticamente en el segundo día de entrenamiento. En los días posteriores, esto se acentuó: para las latencias (ANOVA de una vía RM; factor día $F=76.85$, $GL=26$, $p<0.0001$; test post-hoc de Dunnet día 2 vs 1 (control) $p<0.001$; días subsiguientes vs día 1 $p<0.0001$). Para los errores (ANOVA de una vía RM; factor día $F=1.997$, $GL=26$, $p<0.0001$; test post-hoc de Dunnet día 2 vs 1 (control) $p<0.001$; días subsiguientes vs día 1 $p<0.0001$) (Fig 6B). La exploración del agujero meta disminuyó significativamente desde el *probe trial* 0 al 6 (ANOVA de una vía RM; factor PT $F=1.178$, $GL=6$, $p<0.0001$; test post-hoc de Dunnet $p<0.05$ desde el PT 3 en adelante vs PT 0 (control)) (Fig 6C).

Como se muestra la Fig 6C, los animales pierden interés (se habitúan) en explorar el agujero meta después del tercer PT. Sin embargo, las ratas intentan escapar del laberinto

explorando otros agujeros, lo cual muestra que no pierden motivación. Además, observamos que los animales recorren distancias similares en todos los PTs (**Fig 6D**).

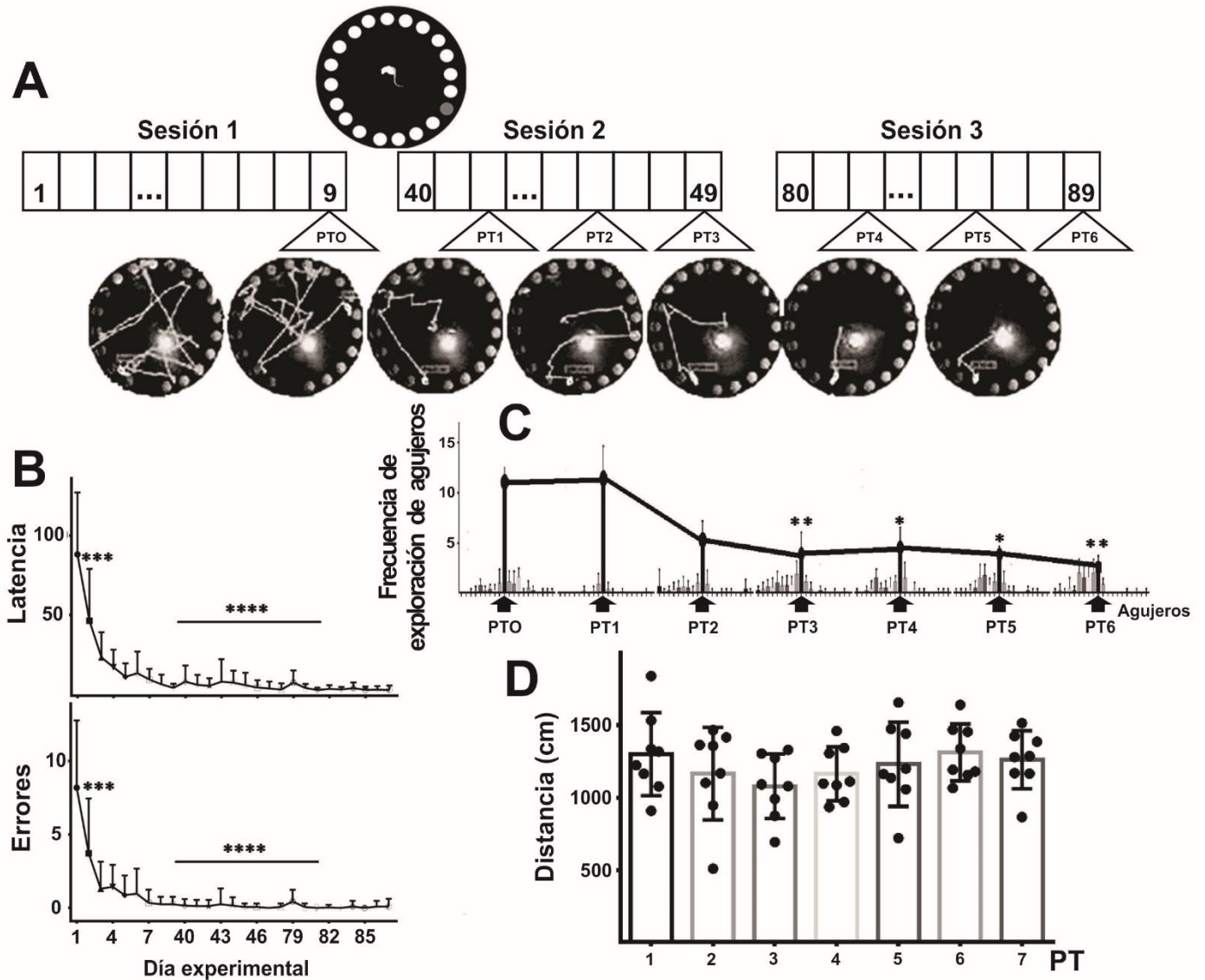


Figura 6. Diseño experimental y análisis del comportamiento en el BM. En A se ilustra el diseño experimental del test de comportamiento. Se realizaron 3 sesiones de entrenamiento separadas por un intervalo de un mes cada una. Cada sesión estuvo constituida por 9 días experimentales, con 4 AT cada día. En el panel inferior vemos patrones representativos de las trayectorias seguidas por los animales con el curso de los ensayos. Nótese al final de los ensayos la trayectoria rectilínea. En B se muestran los gráficos de latencias y errores en los ATs a lo largo del experimento. En C se graficaron los histogramas representativos de la exploración de agujeros y en D las distancias recorridas en los PTs [$*=p<0.05$; $**=p<0.01$; $***=p<0.001$; $****=p<0.0001$].

2.4.2. El entrenamiento de largo plazo en el BM incrementa la espinogénesis en neuronas de CA1 y GCL

La morfología y la densidad de espinas dendríticas fue evaluada con la tinción de Golgi Colonnier (**Fig 7 A-D**); debido a que esta tinción es susceptible a artefactos, previamente la validamos comparando por observación microscópica neuronas teñidas con Golgi y aquellas teñidas para GFP. El fundamento de esto fue crear un control positivo de marcación de la neurona entera, ya que la GFP presenta una localización citoplasmática. Como se esperaba, observamos que la tinción de Golgi tiñó el soma y los procesos neuronales, al igual que la IHQ para GFP. Sin embargo, mediante microscopía de campo claro solo son posibles distinguir las espinas dendríticas con la tinción de Golgi (**Fig 7 E-F**).

Para determinar el efecto del entrenamiento de largo plazo en la espinogénesis del hipocampo, medimos densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 y en neuronas de la GCL. Encontramos que en ambas regiones las ratas entrenadas en el BM presentaban una densidad de espinas mayor que las naive (test-t no pareado, $p=0.0043$ y $p=0.0347$ para CA1 y GCL, respectivamente) (**Fig 7 G-H**).

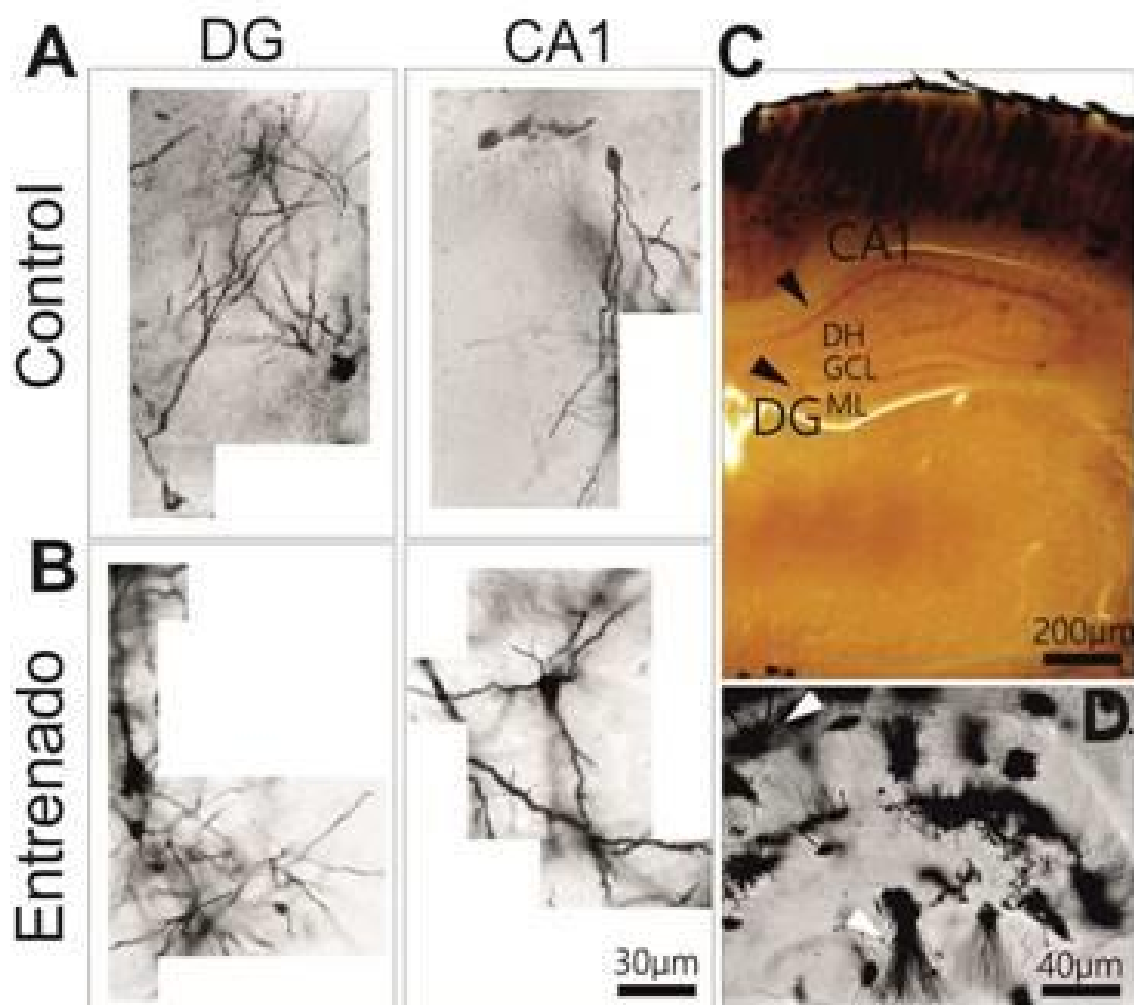
2.5. Discusión

A partir del protocolo básico del paradigma del BM, al igual que otro grupos [**Vargas y col., 2011**], hemos adaptado el protocolo de acuerdo a las necesidades específicas de nuestros experimentos. Por ejemplo, hemos utilizado al BM para evaluar la memoria espacial de las ratas en dos 2 PTs: uno a 1 día y otro a 5 días después de la etapa de aprendizaje [**Morel y cols., 2015**].

Este trabajo muestra que un entrenamiento de largo plazo en el BM impacta sobre el comportamiento y la morfología neuronal de las ratas. Nuestros resultados muestran que las ratas aprenden rápidamente a realizar el test y tienen una clara preferencia por el agujero meta en los ATs, lo cual continuó hasta el último AT (día experimental 89, **Fig 6A**). Sorprendentemente, cuando las ratas realizaron el cuarto PT, perdieron aproximadamente el 60% de su interés original en explorar el agujero meta, esta tendencia continuó hasta el último PT (PT 6 al día 89; **Fig 6 A y C**). Por lo tanto, no es posible evaluar la memoria espacial después del tercer PTs. No obstante esto, como se mostró en la **Figura 6C**, los animales no pierden motivación en escapar del laberinto. Además, observamos que los animales recorrieron distancias similares en todos los PTs, lo cual indica que su falta de interés en explorar el

agujero meta no se debió a una merma en la movilidad (**Fig 6D**). Interesantemente, algunos animales saltaron de la plataforma durante los PTs 5 y 6 (datos no mostrados), lo cual refuerza que estaban efectivamente motivados a escapar del laberinto.

Estudios previos demostraron que el mero hecho de mantener a un animal en un EE en vez de en su caja habitual tiene un impacto significativo sobre las neuronas hipocampales, el aprendizaje y la memoria [van Praag y col., 2000; Kempermann y col., 1999]. Basados en esto, nos preguntamos si someter a las ratas a un largo entrenamiento podría tener un efecto sobre la espinogénesis hipocampal, en particular en 2 regiones del hipocampo asociadas a memoria espacial, las neuronas piramidales de CA1 y las de la GCL en el DG [Goodrich y col., 2008].



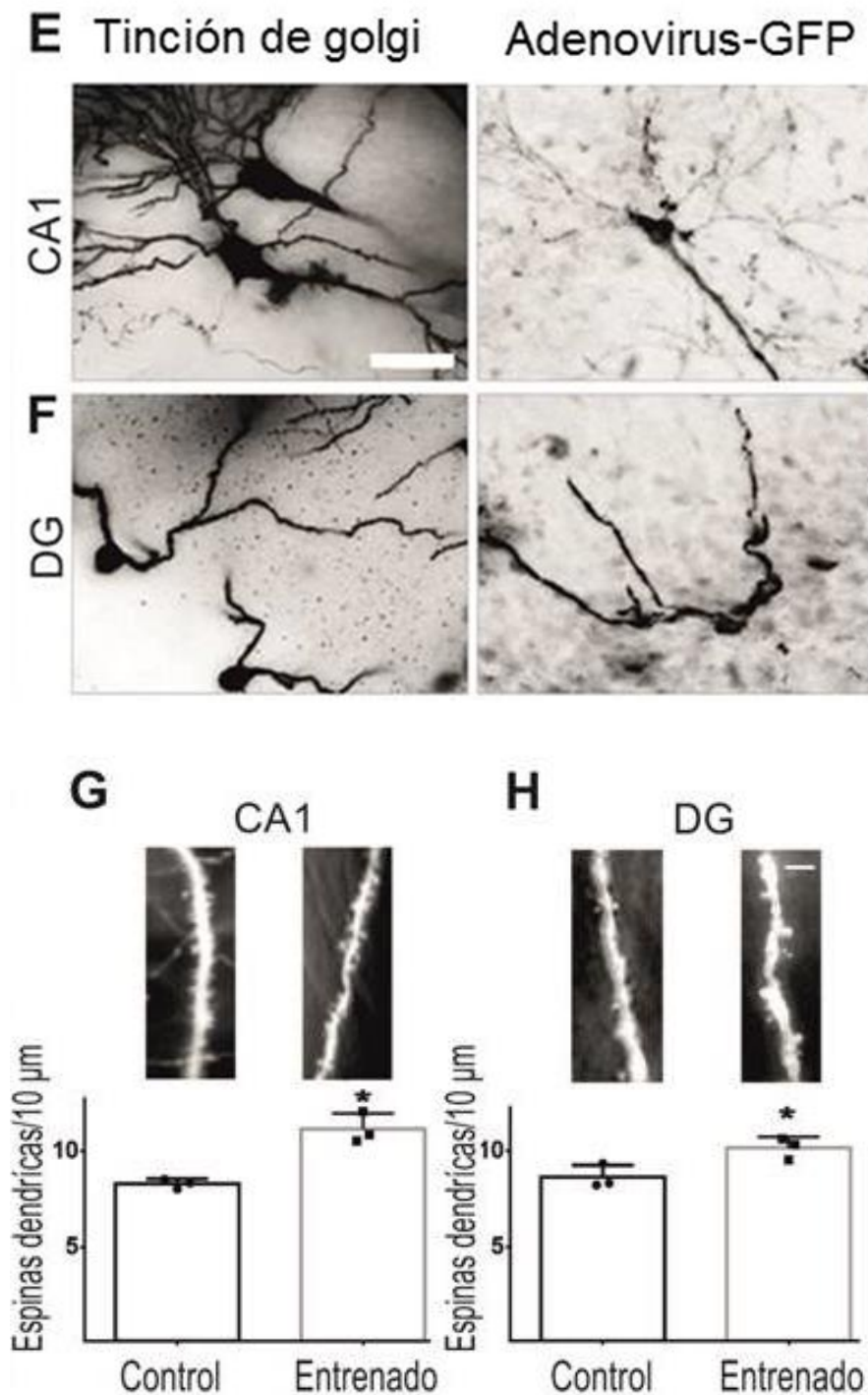


Figura 7. Morfometría de neuronas hipocampales de animales que realizaron el entrenamiento en el BM. A-D. Imágenes representativas de neuronas de la región CA1 teñidas con la técnica de Golgi en ratas control y entrenadas. (Barras de escala=30 μm , 40 μm , 200 μm). **E-F.** Imágenes representativas de neuronas teñidas con Golgi e IHQ para GFP en CA1 y DG. Nótese que ambas tinciones permiten, de forma similar, ver toda la morfología neuronal (barra=25 μm). **G-H.** Densidad de espinas dendríticas en CA1 y DG de ratas naive o entrenadas. Significación estadística vs. el control $p<0.05$; barra=2 μm .

Para delinear la morfología de las espinas dendríticas utilizamos la tinción de Golgi. Esta técnica nos provee de una tinción estocástica de neuronas por la deposición de sales de plata en sus membranas. Si bien la variante de Golgi más frecuentemente utilizada es el método 'Golgi-cox' [Gibb y cols., 1998], en nuestros estudios realizamos la técnica de Golgi Colonnier dado que es más económica y sencilla [DeFelipe & Fairén, 1988]. Para ello realizamos la puesta a punto de la técnica en nuestro laboratorio y la validamos mediante la comparación microscópica de neuronas teñidas con esta técnica y con IHQ para GFP en neuronas de CA1 y GCL. Observamos una notable similitud en la marcación de la morfología

neuronal con ambas metodologías. Finalmente, nuestro análisis demostró que efectivamente el entrenamiento tuvo un efecto similar al EE sobre la espinogénesis hipocampal.

Capítulo 3. Estudios sobre el impacto del envejecimiento sobre la memoria y el hipocampo: Identificación de una impronta transcriptómica asociada con un ambiente inflamatorio en el hipocampo de ratas viejas

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Hippocampus*.

Pardo J, Abba MC, Lacunza E, Francelle L, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. Identification of a conserved gene signature associated with an exacerbated inflammatory environment in the hippocampus of aging rats. *Hippocampus*. 2017 Apr;27(4):435-449.

3.1. Resumen

Si bien se han documentado algunos trabajos de transcriptómica en el hipocampo de roedores viejos, la mayoría de estos ha sido en machos. En este estudio, determinamos los cambios que se dan con el envejecimiento en la memoria espacial y la morfometría del hipocampo, luego comparamos estos cambios con aquellos dados en el transcriptoma hipocampal. Las ratas viejas presentaron déficit en la memoria espacial en comparación con su contraparte joven. Ambos grupos mostraron en el BM un claro pico de exploración en el agujero meta, pero la amplitud de este pico fue significativamente mayor en los animales jóvenes. En el hipocampo de las ratas viejas se observó una marcada reducción de la neurogénesis y la presencia de infiltrados de microglia revelaron un estado inflamatorio. Las mediciones de volumen del hipocampo revelaron que el DG de las ratas viejas es de mayor tamaño que el de las ratas jóvenes evaluadas, no encontrándose diferencias en el volumen del SR. El secuenciamiento de ARN demostró que 210 genes están diferencialmente expresados (DE), la mayoría de estos subexpresados. Nuestros datos mostraron que varios genes involucrados en la respuesta inmune, incluyendo *Tyrobp*, *Cd11b*, *C3*, *Cd18*, *Cd4* y *Cd74*, se sobreexpresan en el hipocampo de ratas viejas hembra. El análisis de enriquecimiento funcional mostró que las vías sobrerrepresentadas en las ratas viejas coinciden con una respuesta inflamatoria exacerbada, lo cual refuerza nuestros resultados morfométricos. Después de correlacionar nuestros resultados con bases de datos públicas de transcriptoma de hipocampo de humano y ratón, encontramos una impronta transcriptómica de 11 genes que se sobreexpresan en todas estas especies. Estos 11 genes están relacionados a procesos inflamatorios. De esta manera, el transcriptoma del hipocampo senil en ratas hembra

comparte similitudes con ratones y humanos. Interesantemente, encontramos además que la impronta de los 11 genes está sobreexpresada en otras regiones del cerebro viejo, así como en enfermedades neurodegenerativas y en tumores cerebrales. Concluimos que nuestro estudio refuerza la propuesta de enfocarse en el tratamiento de la neuroinflamación para contrarrestar el deterioro cognitivo presente en ancianos, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y en pacientes con cáncer de cerebro.

3.2. Objetivos específicos

- Estudiar la reducción en la neurogénesis hipocampal asociada al envejecimiento en nuestra colonia de ratas.
- Evaluar el cambio asociado al envejecimiento en el número de células microgliales reactivas y no reactivas en nuestra colonia de ratas.
- Evaluar por secuenciamiento de ARN improntas de expresión génica relacionadas al envejecimiento del hipocampo en la rata y comparar estos datos con bases de datos de transcriptómica humana relacionada a condiciones neurodegenerativas.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1 Animales

Se utilizaron ratas SD hembra de 2 meses (jóvenes, N=8) y de 28 meses (viejas, N=8), de peso corporal promedio 199 ± 1 g y 267 ± 5 g, respectivamente.

3.3.2 Evaluación de memoria espacial: diseño experimental

La memoria espacial se evaluó con un protocolo adaptado del BM. Brevemente, al principio del test, las ratas se habituaron colocándolas 180 s en las cajas de salida y de escape. Los AT duraron 120 s y los PT 90 s. El día del primer AT fue llamado día experimental 1. Las ratas fueron sometidas a una sesión de aprendizaje de 9 días cada una, con 4 ATs cada día. Al último día de la sesión se realizó un PT (llamado PT0), 15 minutos después del último AT. Para seguir el comportamiento en el tiempo, un mes después del PT0, las ratas fueron sometidas a una sesión corta de aprendizaje de 3 días, con 4 ATs cada día. El último día (día

41), se realizó otro PT (PT1) (**Fig 8B**). El fundamento de este diseño fue que evaluar la memoria espacial dos veces proporcionaría una estimación más robusta de las diferencias entre ratas jóvenes y viejas. En este sentido, era esperable que las ratas jóvenes tuvieran un mejor rendimiento que las viejas en ambos tiempos evaluados.

3.3.3. Procesamiento de cerebros

Al final del experimento se procedió a la eutanasia de los animales. La mitad se realizó por decapitación rápida, estos cerebros se disecaron y se procesaron para secuenciamiento de ARN como se detalla en **3.3.6**. El resto de las ratas fueron anestesiadas con ketamina (40 mg/kg; ip) y xilacina (8 mg/kg; im) y perfundidas con formol 4% en buffer PB. Los cerebros fueron removidos y se post-fijaron en formol 4% en buffer PB por un día a 4°C. Luego, los cerebros fueron conservados en solución criopreservadora a -20°C hasta ser usados. Para la IHQ, los cerebros se cortaron de forma coronal en secciones de 40 µm con un vibrátomo.

3.3.4. Inmunohistoquímica

La IHQ se realizó en secciones en flotación. Para cada animal, las secciones fueron procesadas con un anticuerpo primario policlonal hecho en cabra anti-DCX (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8066) o con un anticuerpo primario policlonal hecho en conejo anti Iba-1 (dilución 1:1000; Wako Cat#016-20001). Después de incubar las secciones por un día a 4°C con anticuerpo primario, estas fueron incubadas con anticuerpos biotinilados hechos en caballo anti-cabra (dilución 1:1000; Vector Laboratories Cat# BA-9500) o anti-conejo (dilución 1:300; Vector Laboratories Cat# BA-1000) por 2 horas. Luego se incubaron con complejo avidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:500; Vector Laboratories Cat# PK-6100) por 90 minutos y se revelaron con DAB. Posteriormente, las secciones se contracoloraron con Violeta de cresilo (tinción de Nissl) incubándolas durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las secciones fueron deshidratadas y montadas con Vectamount (Vector Laboratories).

3.3.5 Recuento de neuroblastos, células microgliales y estimación del volumen en el hipocampo

Para cada cerebro, una de cada 6 secciones coronales se seleccionaron para obtener un set de secciones representativo no continuo. Típicamente, un hipocampo dorsal entero consta de 48 secciones coronales, lo cual permite tener 8 sets de secciones seriales no continuas separadas por 240 μm . El análisis morfométrico y el recuento de células se realizó en el hipocampo dorsal, el cual típicamente se encuentra entre las coordenadas -2,8 y -4,5 AP relativas al Bregma [Paxinos y cols, 1998]. Para esta tarea utilizamos nuestro microscopio Olympus BX-51 adosado a una cámara CCD DP70 (Tokio, Japón). Todos los parámetros morfométricos se determinaron bilateralmente. En el hipocampo, realizamos el recuento celular de neuronas inmaduras en el DG y células de la microglia en el DH y en el SR, respectivamente. Estas regiones son particularmente vulnerables a degeneración en pacientes con la AD [West y col., 1994].

Específicamente, la determinación estereológica de neuroblastos inmunoreactivos para DCX (DCXir) se realizó en la SGZ y en la GCL del DG. El número de células DCXir fue determinado utilizando un procedimiento modificado del fraccionador óptico ya descrito en nuestro laboratorio [Morel y col., 2015]. La estimación del número de células bilaterales fue calculada con la fórmula $N = RQR \cdot 1/ssf \cdot 1/asf \cdot 1/tsf$, en donde RQR es la suma de las células contadas, ssf la fracción de muestreo de secciones, asf la fracción de muestreo de área y tsf la fracción de muestreo de espesor (por sus siglas en inglés).

En este caso, las secciones enteras de DG fueron tomadas como marco de recuento (mejor conocido en inglés como 'counting frame'). Por lo tanto, para este caso, la asf fue =1. La ssf fue, como se dijo antes, =1/6. Se contaron células DCXir con cuerpo neuronal en foco. N=3 animales por grupo.

Las células de la microglia fueron identificadas como inmunoreactivas para Iba-1 (Iba1ir) y contadas en las regiones SR y DH [Paxinos y col., 1998]. Para este fin, una plantilla cuadrada de 5625 μm^2 fue colocada al azar sobre imágenes tomadas a un aumento de 400X. Las células que cayeron dentro del área de la plantilla fueron contadas. Dentro del área de la plantilla se contaron las células que hicieron contacto con la líneas de inclusión, mientras que las que hicieron contacto con la línea de exclusión no fueron tenidas en cuenta. Las células Iba-1ir fueron clasificadas como tipo I,II,III,IV y V de acuerdo a criterios publicados previamente [Diz-Chaves y col., 2012], N=3 animales por grupo. El procedimiento para contar células microgliales es distinto al del fraccionador óptico, así como la estadística

empleada para este análisis. Esto se debe a que no se obtuvo igual número de secciones para IHQ de Iba-I entre los grupos joven y viejo. Por lo tanto, en aras de obtener rigor estadístico para comparar las medias de ambos grupos, fue preciso recurrir a un análisis distinto al de la estimación de células totales por el fraccionador óptico (**análisis estadístico descripto en 3.3.10**).

El volumen del SR y del DH fue estimado con el método de Cavalieri [Howard & Reed, 2005]. Se siguió la fórmula $V = t \times \sum A_i$, en donde t es la distancia entre las secciones y $\sum A_i$ representa la suma de áreas de cada sección. Para calcular las áreas, se realizó un muestreo aleatorio utilizando una grilla de puntos separados por $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. Esta plantilla fue creada por el software Image Pro Plus v5.1 sobre imágenes calibradas tomadas a un aumento de 200X. De esta manera, las regiones de SR y DH fueron identificadas en secciones teñidas con Nissl y sus áreas fueron estimadas multiplicando el recuento de puntos que caían en estas regiones por $100000 \mu\text{m}^2$.

3.3.6 Extracción de ARN, preparación de library y secuenciamiento

Se procedió a la eutanasia con guillotina de cuatro ratas por grupo y rápidamente se disecó el hipocampo derecho para el análisis del transcriptoma. El hipocampo fue conservado a -80°C . Para la extracción de ARN el tejido fue homogenizado con el reactivo TRIzol (Life Technologies). La calidad del ARN extraído fue determinada midiendo el RIN (RNA Integrity Number) utilizando el software Fragment Analyzer. La preparación de la library para RNAseq fue realizada con el kit comercial truSeq RNA Sample Preparation Kit tomando como material de partida 500 ng de ARN total. La cuantificación de las librerías de ADNc fue realizada utilizando el sistema QuantiFluor™ dsDNA System (Promega). El rango de tamaño de las librerías de ADNc fue 280-320 bp y fue determinado mediante el paquete DNA Chip for NGS Libraries usando el software Fragment Analyzer (Advanced Analytical). Las librerías de ADNc fueron amplificadas y secuenciadas utilizando los equipos cBot y HiSeq2000, de Illumina (lectura única; 50 bp; aproximadamente. 30–35 millones de lecturas por muestra).

3.3.7. RT-qPCR

La retrotranscripción se realizó sobre 400 ng de ARN por muestra utilizando el kit comercial Qiagen QuantiTect Reverse transcription kit (#205310), siguiendo las instrucciones

del fabricante. La qPCR se llevó a cabo con el reactivo MESA BLUE qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay Low ROX en un Sistema de qPCR Stratagene Mx3000P. Los primers utilizados se listan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Primers empleados para la validación de genes por RT-qPCR

Gen	Secuencia de primer forward	Secuencia de primer reverse	Tamaño de amplicón (en bp)
Cdh3	ACGTGGCACCAACCTTCAT	CACTGCCCTCGTAGTCAAACA	159
Gpr183	CATCCTCATCATCGGCGTGT	AAGGAGTGTCTCACCCACACA	120
Kcnj13	TGCTCCTAGGCCTCATGCTA	AGTACAGCAGAGACCCGAAC	199
Slc22a2	GCTGTTGCTACCTGAGACCA	CGGTCTGCTTGCTTGACTTG	124
Mfip	CTGGACCTGACCTGTGAACC	CGGAAAGTCTGGTAGCAGGG	167
C3	AGCCAGTTACCTGAACCTGC	CGGTTCCGATCTTTGGCTGT	126
Tyrobp	AGGGACTGCAGACGGGAC	TGCCTCTGTGTGTTGAGGTC	111
Itgb2	ATGAGTTCGACTACCCGTCAG	TGGAATCGTCAGACAGCTCG	159
bactin	GGGAAATCGTGCGTGACATT	ATGGTGGTGCCGCCAGACAG	149

3.3.8. Análisis del secuenciamiento de ARN

Las imágenes fluorescetes del Illumina HiSeq 2000 fueron transformadas a archivos BCL con el software Illumina BaseCaller y las muestras fueron decodificadas a archivos FASTQ con el software CASAVA (versión 1.8.2). La calidad del secuenciamiento se chequeó y aprobó con el software FASTQC. Las secuencias fueron alineadas al genoma de referencia de *Rattus Norvegicus* (RGSC assembly v5.0) utilizando el software de alineamiento STAR [Dobin y col., 2013; versión 2.3.0e], permitiendo una tasa de mismatch de 2 cada 50 bases. Luego, los archivos SAM resultantes fueron convertidos a archivos BAM. El filtro de hits únicos y el conteo fue llevado a cabo con las herramientas SAMtools, versión 0.1.18 [Li y col., 2009] y HTSeq version 0.6.1p1 [Anders y col., 2015]. Para identificar los genes diferencialmente expresados entre las muestras de hipocampo de ratas jóvenes y viejas, se utilizó el algoritmo DESeq2, el cual se basa en el número normalizado de cuentas mapeadas para cada gen [Love y col., 2014]. Los análisis de enriquecimiento funcional se realizaron con las herramientas DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), e InnateDB (<http://www.innatedb.com/>). Estos análisis se basaron en la lista de transcritos desregulados entre los grupos (P-adj. <0.05; fold changes >2). La integración de los datos y la visualización del heatmap de los transcritos DE se realizó con el programa R y el software Multi Experiment Viewer (MeV v4.9) [Saeed y col., 2014]. Por otra parte, utilizamos el algoritmo ESTIMATE (Estimation of Stromal y

Immune cells in Malignant Tumors using Expression data) para inferir el componente inmune de cada muestra hipocampal de ARNm [Yoshihara y col., 2013].

3.3.9. Análisis comparativo de la impronta transcriptómica del envejecimiento en el hipocampo

El perfil de expresión génica de los 210 genes DE en hipocampo de ratas jóvenes y viejas fue comparado con datos de transcriptoma de humano. De esta manera, se obtuvieron datos públicos de microarray (estudio GSE11882) de muestras de individuos humanos viejos. Estos archivos fueron descargados de GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), procesados y normalizados en R/Bioconductor utilizando el paquete fRMA. Este dataset, constituido por microarrays de humanos cognitivamente sanos de edades entre 20 y 99 años, posee la transcriptómica de 4 regiones del cerebro (hipocampo, corteza entorrinal, giro superior frontal y giro postcentral). Para este trabajo utilizamos sólo los datos de hipocampo (n=43). De esta manera, para el total de los 210 genes DE hallados en nuestras muestras, un total de 170 genes ortólogos fueron encontrados en los datos de humanos. De esta manera se obtuvo una matriz final de 43 muestras vs 170 genes. Las muestras fueron categorizadas en 2 grupos: jóvenes (entre 20 y 50 años; n=17) y viejos (entre 51 y 99 años; n=26).

3.3.10. Análisis estadístico

Los parámetros del BM y la estimación de células DCXir fueron analizados con el software Sigma Plot v.11 (Systat Software, San Jose, CA). Para analizar la latencia y los errores en el BM, los datos de ATs de cada día fueron promediados. Estos parámetros fueron analizados con ANOVA de 2 vías con medidas repetidas, considerando a los factores grupo y día experimental. Cuando este ANOVA fue significativo, las comparaciones entre medias se realizaron con el test post-hoc de Holm Sidak. Las estadísticas para la estimación de número de células Iba1-ir fue realizada con el software Statistica v8 (Tulsa, USA). En este caso, se realizó un ANOVA con un modelo anidado mixto, en el cual la varianza fue descompuesta jerárquicamente en 3 categorías: 'grupo experimental' → 'rata' → 'sección de cerebro'. El 'grupo experimental' fue seteado como variable de agrupamiento fija, mientras que 'rata' y 'sección de cerebro' fueron seteadas como variables al azar. Finalmente, los datos de recuento de células Iba1-ir fueron seteados como variable dependiente. Cuando el ANOVA fue

significativo, el test LSD (Least significant difference) de Fisher, de comparaciones múltiples, fue utilizado para evaluar las diferencias entre medias. $P < 0.05$ fue seteado como significativo.

Para obtener los genes DE entre los grupos de humanos jóvenes (entre 20 y 50 años; $n=17$) y viejos (entre 51 y 99 años; $n=26$) (3.3.9), se realizó un test-t ($P < 0.05$).

Las medidas de volumen fueron analizadas con test-t de Student, no pareado. Los gráficos fueron realizados con el software Sigmaplot v.11 y muestran las medias \pm error estándar.

3.4. Resultados

3.4.1. Cambios en el aprendizaje y en la memoria espacial de las ratas asociados al envejecimiento

Latencia: Después del día 1 (AT1-4), la latencia en las sesiones de entrenamiento cayó rápidamente en ratas jóvenes y viejas, llegando a una meseta cerca del día 4 (ANOVA RM de 2 vías factor día $GL=11$; $F=49,057$; $P < 0,001$), que se mantuvo relativamente constante hasta el día 41 (el último día del test, AT45-48). Durante este periodo, del día 4 al 41, la latencia en los AT fue menor en el grupo joven en comparación con el viejo (**Fig. 8A, gráfico superior**) (ANOVA RM de 2 vías factor grupo $GL=1$; $F=4,922$; $P=0.044$; test de Holm-Sidak $P < 0.05$ para los días 7, 8, 9, 39, 40, y 41). Asimismo, el grupo joven mostró una latencia menor en ambos PTs (test de Mann-Whitney $P=0,015$ y $P=0.003$ para PT0 y PT1, respectivamente) (**Fig. 8A, gráfico superior, inset**).

Errores: Durante las sesiones de entrenamiento, los errores cayeron abruptamente en ambos grupos hasta alcanzar una meseta a los días 3-4 (ANOVA RM de 2 vías factor día $GL=11$; $F=20,570$; $P < 0,001$). En este período, los animales jóvenes cometieron menos errores que los viejos (**Fig. 8A, gráfico inferior**) (ANOVA RM de 2 vías factor grupo $GL=1$; $F=32,740$; $P < 0,001$) (test de Holm-Sidak para día 4 $P=0,223$). Del mismo modo, el grupo joven cometió menos errores que el viejo en los PT0 y PT1 (test t de Student $P < 0,001$ y test de Mann-Whitney $P < 0,001$ para PT0 y PT1, respectivamente) (**Fig. 8A, gráfico inferior, inset**).

Exploración de agujeros: En ambos grupos, la exploración de agujeros mostró un pico en el agujero meta en ambos PTs (**Fig. 8C**), siendo la amplitud de este pico significativamente mayor en los animales jóvenes respecto a los viejos (test-t de Student $P=0.015$ y test de Mann-Whitney $P < 0.001$ para PT0 y PT1, respectivamente).

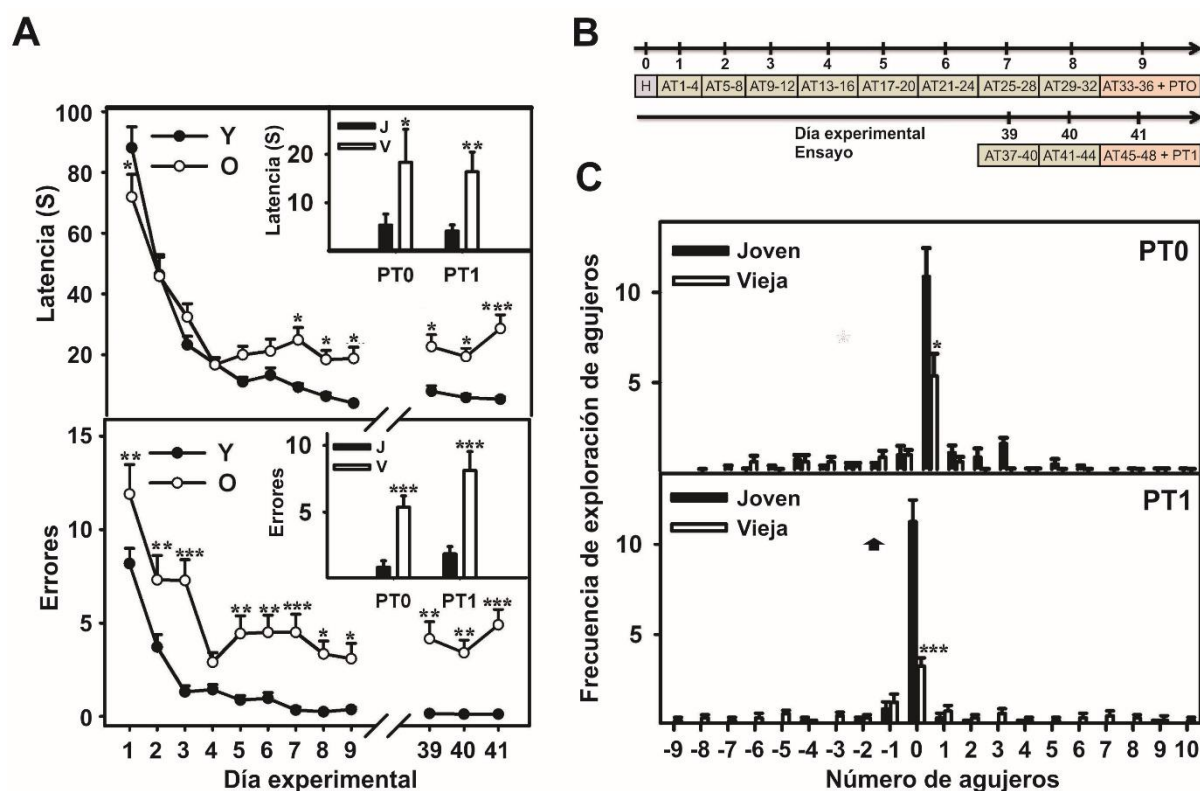


Figura 8. Efecto del envejecimiento sobre el aprendizaje y la retención de memoria espacial. **Panel A. Gráfico superior.** Se muestra la latencia a lo largo del tiempo en las sesiones de entrenamiento y en los PTs (inset) en ratas jóvenes y viejas. **Gráfico inferior.** Se muestra el número de errores a lo largo del tiempo y en los PTs (inset) en los mismos animales. **Panel B.** Diagrama en donde se ilustra el diseño experimental utilizado. El aprendizaje se evaluó realizando 48 ATs durante 12 días (4 ATs por día) con un intervalo de 30 días entre la primera y la segunda sesión. **Panel C.** Exploración de agujeros en los PTs. Nótese la preferencia por el agujero 0 (meta) en ambos grupos y el deterioro por esta preferencia asociado al envejecimiento. Los datos están presentados como la media ± error estándar. Las comparaciones se presentan versus el dato correspondiente a la rata joven. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. El número de ratas jóvenes y viejas fue de 8 para cada grupo.

3.4.2 Cambios morfométricos en el hipocampo dorsal relacionados al envejecimiento

Para estudiar si los cambios en el comportamiento estaban relacionados con cambios morfométricos en el cerebro, medimos por estereología no sesgada la estimación de células DCXir en el DG, células de la microglia Iba-1ir en el SR y DH y el volumen del SR y DH del hipocampo dorsal. Encontramos una reducción dramática en el número de neuronas inmaduras DCXir en el DG de ratas viejas comparadas con su contraparte joven (test-t de Student $P < 0.001$) (**Fig. 9 A–C**).

Las células Iba1ir fueron clasificadas como no reactivas (tipos I, II y III) y reactivas (tipos IV y V), y contadas en el SR y DH. En el SR no se observaron diferencias significativas en el número total de células Iba1ir (ANOVA factor grupo $F = 1.710$; $P = 0.262$), pero se observó un

incremento significativo de células microgliales reactivas en las ratas viejas respecto a las jóvenes (ANOVA factor grupo $F=9,200$; $P=0.0402$) (test LSD 0,0321) (**Fig. 9 D–F**). El análisis estereológico de células microgliales en el DH mostró que no hubo diferencias entre animales jóvenes y viejos tanto para microglia no reactiva como para reactiva (ANOVA factor grupo $F=0,3917$; $p=0,5653$ y $F=4,9788$; $p=0,08944$ para microglia no reactiva y reactiva, respectivamente). Por tanto, registramos un claro aumento de infiltrados de microglia reactiva en la zona del SR de ratas viejas.

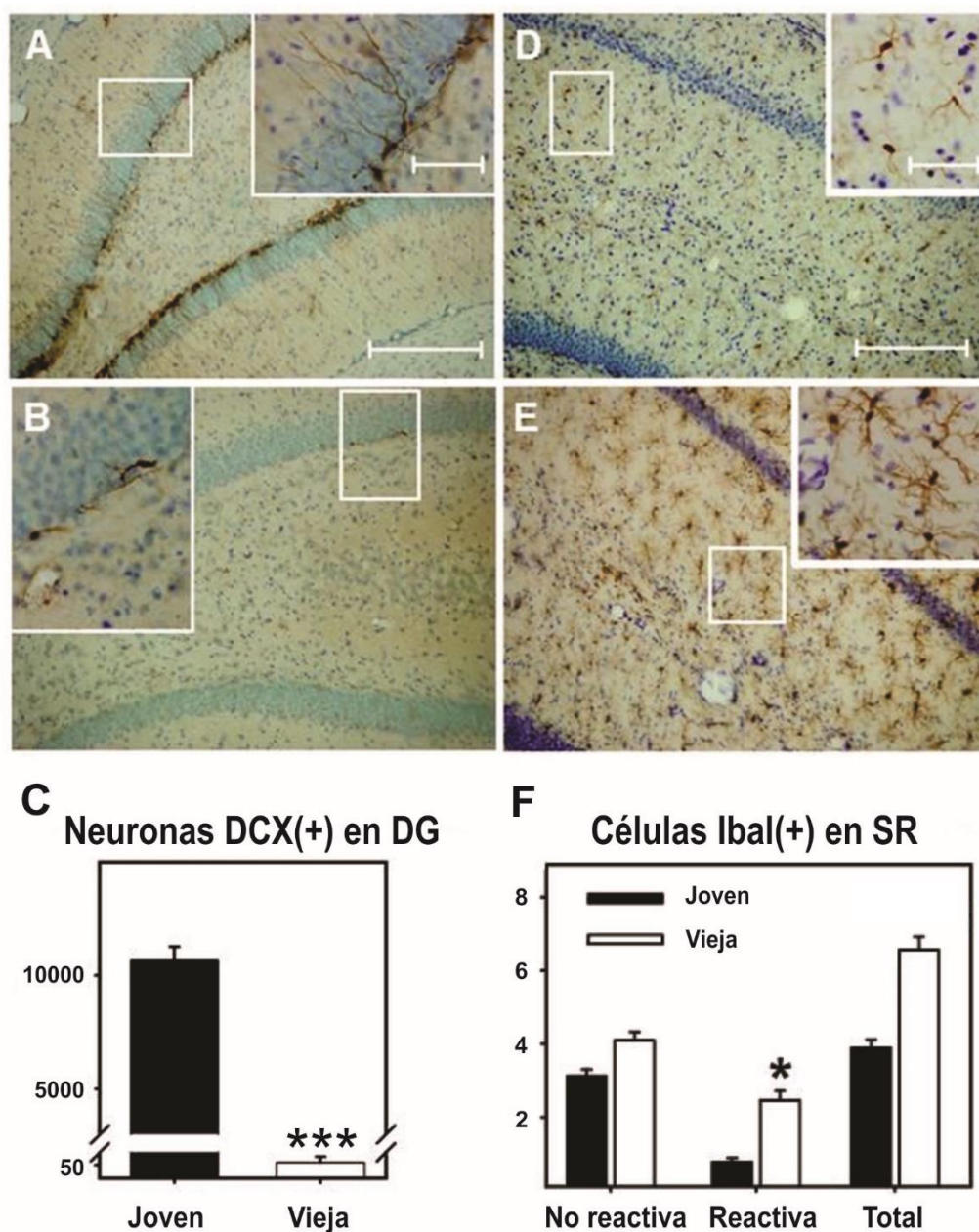


Figura 9. Expresión de DCX e Iba-1 en el hipocampo dorsal de ratas jóvenes y viejas. Se muestran imágenes representativas del DG para el caso de células DCXir (**paneles A y B**) y del SR para células Iba-1ir (**paneles D y E**). Los datos del recuento se muestran en los paneles **C** y **F** para DCX e Iba-1, respectivamente. Los paneles **A** y **D** muestran hipocampos de ratas jóvenes mientras que los paneles **B** y **E** hipocampos de ratas viejas. Nótese la caída abrupta de células DCXir y el incremento de la microglia reactiva en las ratas viejas. El número de hipocampos analizados fue de 3 para cada grupo experimental. Las cifras de las ordenadas representan estimación de células totales en hipocampo bilateral para el caso de DCX mientras que para Iba-1 representan células por campo de 400X. Escala: 200 μ m para las imágenes panorámicas y 50 μ m para los insets.

Las mediciones de volumen indicaron que los grupos para el caso del SR no presentan diferencias significativas, sin embargo las ratas viejas tienen un DH más voluminoso que las jóvenes (test-t no pareado; GL=4; $t=0,1218$; $p=0,4$ para SR y GL=4; $t=4,026$; $p=0,0158$) (**Fig. 10**).

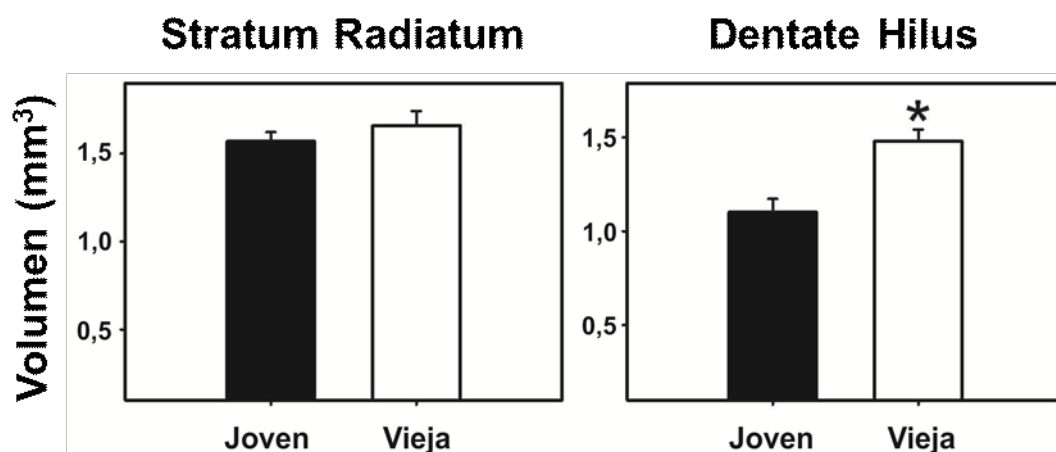


Figura 10. Volumen de las regiones del hipocampo SR y DH de ratas jóvenes y viejas. Los gráficos muestran las medias \pm error estándar. * $P<0,05$.

3.4.3 Cambios de expresión génica en el hipocampo asociados al envejecimiento

El estudio de agrupamiento jerárquico no supervisado de los perfiles de secuenciamiento de ARN demostró una clara segregación de los hipocampos jóvenes y viejos (**Fig. 11A**). El análisis estadístico reveló que hay 210 transcritos DE entre las muestras de hipocampo joven y viejo ($p\text{-adj}<0.05$; Fold changes >2). De entre los genes DE, 81 estuvieron sobreexpresados y 129 subexpresados en ratas viejas (**Fig. 11B**). Los 20 genes más sobre y subexpresados se muestran en la **Tabla 2**. Además, esta tabla muestra en qué tipo de célula del CNS se expresan los genes enlistados.

Para identificar procesos biológicos afectados por el envejecimiento, realizamos un análisis de enriquecimiento funcional utilizando DAVID. El análisis por GO (del inglés, 'Gene ontology') de transcritos desregulados entre los 2 grupos reveló términos GO relacionados a procesamiento antigénico via MHC II- respuesta inmune, adhesión celular, vías mediadas por integrinas, organización de la matriz extracelular y respuestas a corticosteroides y hormonas esteroideas (**Fig. 11C**).

Tabla 2: Lista de los 20 genes más sobre y subexpresados.

Gen	Descripción	logFC	Fuente celular
Slc9a3	solute carrier family 9, subfamily A	2,545671892	N/S
Bpifb4	BPI fold containing family B, member 4	2,176808781	N/S
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	2,12724301	No encontrado
Cml3	Probable N-acetyltransferase CML3	2,109236546	Mayormente astrocitos, también OPCs
C3	complement component 3	1,98344423	Microglia
Clec5a	C-type lectin domain family 5, member A	1,967973654	Mayormente microglia, también OPC
Fmo3	flavin containing monooxygenase 3	1,967494475	N/S
Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex	1,855301498	Microglia
RT1-Db1	RT1 class II, locus Db1	1,839374172	No encontrado
Clec12a	C-type lectin domain family 12, member A	1,738702616	Microglia
Lilrb3l	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B	1,717229122	Microglia
Cd4	Cd4 molecule	1,699012324	Microglia
Tbx4	T-box 4	1,680920772	Células endoteliales
Card11	caspase recruitment domain family, member 11	1,674925125	Mayormente microglia, también OPC
Pbld1	phenazine biosynthesis-like protein domain	1,620714722	Astrocitos
LSP1	lymphocyte specific 1	1,61610002	Microglia
Aadat	aminoadipate aminotransferase	1,608310278	Mayormente neuronas, también astrocitos y OPCs
Spp1	secreted phosphoprotein 1	1,575763383	Microglia
CTXN3	cortixin 3	1,574417002	Mayormente neuronas, también MOs y OPCs
Gpr183	G protein-coupled receptor 183	1,543275371	Microglia
Slc22a6	solute carrier family 22	-1,62422245	OPCs
Abca4	ATP-binding cassette, subfamily A, member 4	-1,64321896	Células endoteliales
Tead2	TEA domain family member 2	-1,64800887	Mayormente células endoteliales, también astrocitos
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	-1,66032835	OPCs
Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha	-1,66962091	Mayormente OPCs, también astrocitos y células endoteliales
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	-1,68128355	Mayormente células endoteliales, también MOs, NFOs, neuronas y OPCs
Sema3c	sema domain, immunoglobulin domain	-1,68507418	Células endoteliales y neuronas
Thbs2	thrombospondin 2	-1,68850683	Mayormente neuronas, también OPCs, células endoteliales y astrocitos
Cpz	carboxypeptidase Z	-1,70139196	OPCs
Nid1	Nidogen-1	-1,71231858	Células endoteliales
Gstm2	glutathione S-transferase mu 2	-1,75136306	Células endoteliales
Mmp14	matrix metalloproteinase 14	-1,80984891	Mayormente astrocitos, también células endoteliales, OPCs y neuronas
Pcolce	procollagen C-endopeptidase enhancer	-1,88163707	Mayormente OPCs, también células endoteliales
Igfbp1l	insulin-like growth factor binding protein-like 1	-2,07716708	Neuronas
Colla2	collagen, type I, alpha 2	-2,33026789	OPCs
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	-2,41594582	OPCs
Slc22a2	solute carrier family 22, member 2	-2,42319808	N/S
Colla1	collagen, type I, alpha 1	-2,61921284	OPCs
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	-2,76002083	Mayormente astrocitos, también OPCs y neuronas
Igf2	insulin-like growth factor 2, transcript variant 2	-2,91010543	Mayormente OPCs, también células endoteliales y neuronas

Las celdas naranja representan genes sobreexpresados en ratas viejas mientras que las verdes indican genes subexpresados. La fuente celular de ARN ha sido obtenida de una base de datos de transcriptómica del SNC: http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_maseq.html. OPC= progenitor de oligodendrocito, NFO= oligodendrocito recientemente formado, MO= oligodendrocito mielinizante. N/S= Expresión similar en todos los tipos celulares.

Luego, para identificar genes DE en nuestro estudio, así como en otros trabajos con otros animales, realizamos un análisis de enriquecimiento con una base de datos de envejecimiento disponible en el servidor 'Enrichr'. Esto nos permitió identificar un grupo de genes asociados al envejecimiento que estaban significativamente desregulados en rata y ratón (**Fig. 11D**).

Debido a que los procesos desregulados por el envejecimiento estaban relacionados a procesos inmunes, interrogamos un algoritmo para predecir el score de componente inmune entre las muestras. Interesantemente, el algoritmo ESTIMATE predijo un score inmune significativamente mayor en las muestras de hipocampo viejo en comparación con el joven ($P < 0,01$, **Fig. 11E**).

Para validar nuestros resultados de secuenciación de ARN, realizamos RT-qPCR confirmatorias de 8 transcritos representativos (**Fig. 11F**). Genes tales como Tyrobp, C3, Itgb2 o Gpr183 mostraron una inducción de su expresión de 300 a 800 % con el envejecimiento, mientras que Kcnj13, Cdh3, Mfrp, Scl22a2 se comportaron de la forma opuesta, con una represión desde el 400 hasta el 4000 % en animales viejos (**Fig. 11F**).

Luego, en aras de seguir explorando los genes DE en el hipocampo con el envejecimiento, realizamos un análisis *in silico* de muestras de hipocampo humano. La comparación entre los grupos joven y viejo dio como resultado 30 genes ($P < 0.05$) DE en humanos, también hallados entre los 210 de hipocampo de rata. 24 de estos 30 genes estuvieron sobreexpresados, mientras que 6 se subexpresaron en el grupo humano viejo (**Fig 12A**). El cambio más prominente se observó hacia la 7ma década, con una fuerte activación de genes tales como Clec7, Tyrobp, Cd74, Itgb2, C3, Itgam, Gpr183 y Gapt. Asimismo, computamos una matriz de correlación con los 30 genes desregulados y encontramos un cluster de 11 genes, los cuales mostraron el más alto grado de correlación. A este cluster lo denominamos la impronta transcriptómica de los 11 genes (**Fig. 12 B y C; Tabla 3**). Luego, evaluamos a la impronta de los 11 genes respecto al sexo de los individuos donantes de las muestras y hallamos que 7 de los 11 genes están significativamente sobreexpresados en el grupo viejo en ambos sexos, lo cual implica que la impronta transcriptómica es independiente del sexo. En análisis funcional de la impronta de los 11 genes indicó un enriquecimiento en procesos relacionados con la respuesta inmune y la unión de proteínas a MHC. Debido a que estos mismos habían sido los términos ontológicos más fuertemente enriquecidos en los 210 genes DE en ratas viejas, este hallazgo confirmó la robustez y reproducibilidad de la impronta de los 11 genes a lo largo de las especies. Además, tomando en cuenta los datos de enriquecimiento de genes con el envejecimiento, encontramos en datos públicos de un estudio previo que 6 de los 11 genes de la impronta están asociados a la impronta transcriptómica de la región CA3 del hipocampo de

ratas viejas macho ($P < 0.001$, código de acceso: GSE14724). Luego, analizamos la expresión de la impronta de los 11 genes con respecto al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas, tales como AD y HD. En ambas situaciones, obtuvimos una asociación positiva (**Fig. 12 D y E**; $P < 0.001$).

Si bien el déficit cognitivo puede estar relacionado al envejecimiento o a enfermedades neurodegenerativas, otra causa probable puede ser la presencia de tumores en el cerebro. Por esta razón, nos preguntamos si esta impronta transcriptómica también se manifestaría en tumores de cerebro de bajo grado con mal pronóstico y en glioblastoma, el tipo de tumor cerebral primario más común en adultos de entre 45 y 75 años [**Louis y col., 2007**]. Por lo tanto, evaluamos la expresión de la impronta de los 11 genes en la base de datos de tumores de bajo grado (en inglés (Low Grade Brain Tumors) obtenida del Atlas del Genoma de Cáncer (en inglés Cancer Genome Atlas (TCGA)) ($n=530$), la cual incluye astrocitomas, oligoastrocitomas y oligodendrogliomas. El grupo de muestras fue dividido en 2 grupos: 'alta expresión' y 'baja expresión', de acuerdo a la expresión de los 11 genes. Entonces observamos una asociación positiva entre astrocitomas y el grupo 'alta expresión' y oligodendrogliomas con el grupo 'baja expresión' ($P < 0.01$; **Fig. 13 A y B**). Asimismo, realizamos un análisis de sobrevida, el cual reveló que las muestras del grupo 'alta expresión', de las cuales la mayoría eran astrocitomas, tuvo un mal pronóstico de sobrevida y de sobrevida libre de la enfermedad ($P < 0.01$; **Fig. 13 C**).

Para estudiar la relación entre la expresión de la impronta y los glioblastomas, decidimos profundizar en el estudio específico de la relación entre la expresión del gen Tyrobp y la malignidad de los tumores. Nuestra elección del Tyrobp se debió a bibliografía que lo implica en procesos de cáncer de mama [**Shabo y col., 2013**]. Ciertamente, encontramos que la sobreexpresión de Tyrobp está asociada a una menor sobrevida en pacientes con glioblastoma (**Fig 14**).

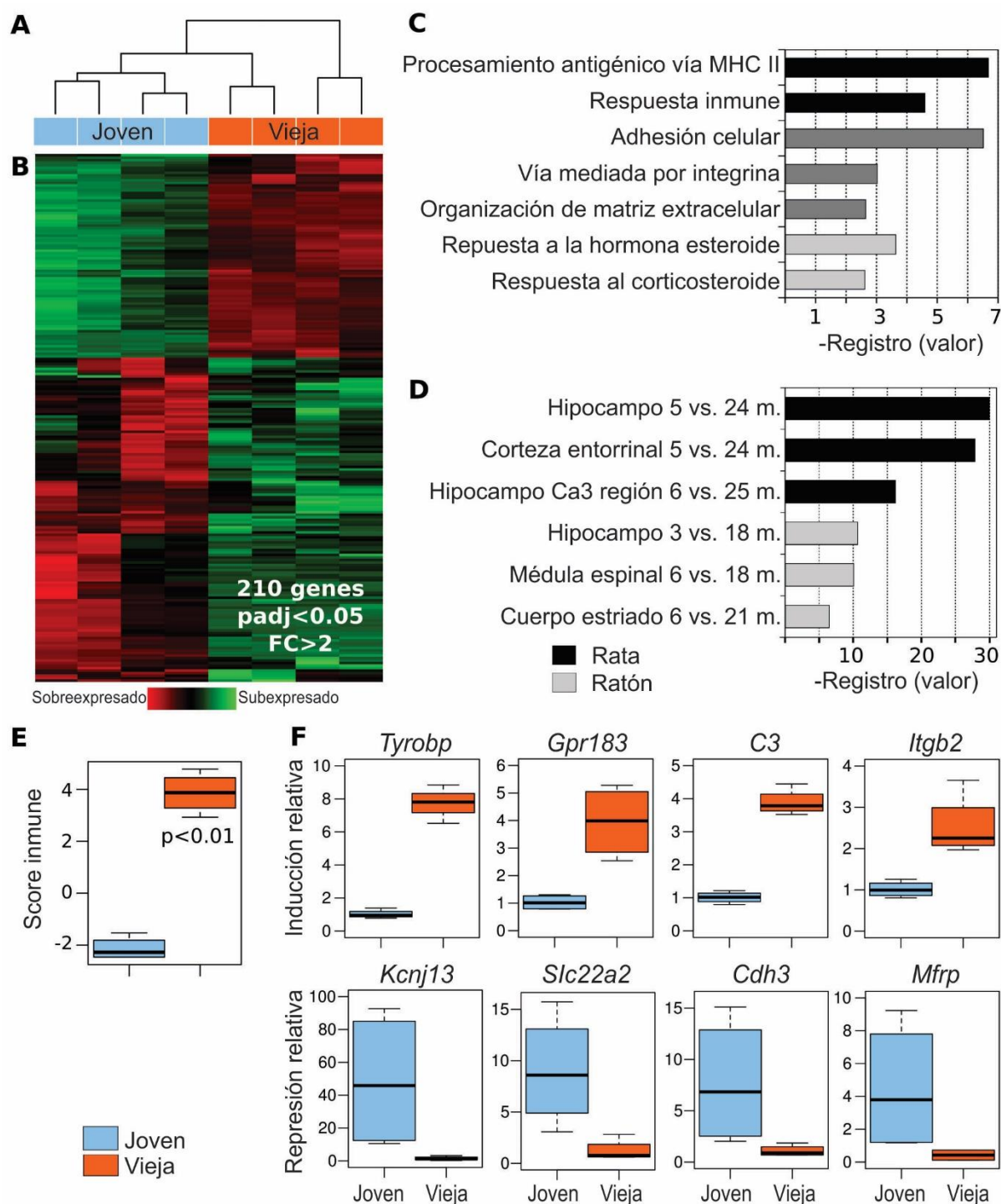


Figura 11. Cambios en la expresión génica relacionados al envejecimiento en el hipocampo.
A. Agrupamiento no supervisado de muestras de hipocampo de rata. **B.** Mapa de calor de los 210 genes DE entre muestras de hipocampo joven y viejo. **C.** Descripción ontológica de genes revelada por el análisis de enriquecimiento funcional. **D.** Grupo de genes asociados al envejecimiento comúnmente desregulados en rata y ratón. **E.** Box plot representando la determinación de ESTIMATE de la diferencia en el score inmune entre ratas jóvenes y viejas. **F.** Box plots de 8 genes representativos validados por RT-qPCR. Los resultados confirman el secuenciamiento de ARN.

Tabla 3. Descripción de la impronta de los 11 genes

Ensembl	Gene ID	Gene Symbol	Description	LogFC
ENSRNOG00000046834		C3	complement component 3	1,98344423
ENSRNOG00000018735		Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	1,855301498
ENSRNOG00000016294		Cd4	Cd4 molecule	1,699012324
ENSRNOG00000025094		Gpr183	G protein-coupled receptor 183	1,543275371
ENSRNOG00000033879		Clec7a	C-type lectin domain family 7, member A	1,232456971
ENSRNOG00000039759		Gpr34	G protein-coupled receptor 34	1,222903325
ENSRNOG00000019728		Itgam	integrin, alpha M	1,197102675
ENSRNOG00000020845		Tyrobp	Tyro protein tyrosine kinase binding protein	1,187167324
ENSRNOG00000026989		Gapt	Grb2-binding adaptor protein, transmembrane	1,17510715
ENSRNOG00000001224		Itgb2	integrin, beta 2 (Itgb2)	1,044682232
ENSRNOG00000028566		Pld4	phospholipase D family	1,030845136

Finalmente, realizamos un análisis de interacción entre proteínas con la herramienta online STRING. Esta mostró que existen fuertes interacciones entre 7 de los 11 genes miembros de la impronta en ratas. Además, observamos que las fuertes interacciones proteína-proteína entre C3, ITGB2, ITGAM y TYROBP están conservadas entre ratas y humanos, lo cual sugiere que estas proteínas están involucradas en un bioproceso conservado evolutivamente (Fig. 15).

3.5. Discusión

Cambios funcionales en el cerebro viejo. A nivel funcional, en las ratas viejas hay un deterioro en la memoria espacial, tal como se ha demostrado en varios tests cognitivos, tales como el Laberinto de Brazos Radiales (Radial Arm Maze) [de Toledo-Morrell y col., 1984], el Laberinto de Agua de Morris [Morris, 1984] y el Laberinto de Barnes [Barnes, 1979]. Como demostramos aquí, la declinación en la memoria espacial está acompañada de una dramática reducción de la neurogénesis en el hipocampo, esta característica está involucrada en la declinación de ciertos tipos de memoria en ratas viejas [Yau y col., 2015]. Algunos autores han dividido a las ratas viejas en dos grupos: viejas no dañadas y viejas dañadas (en inglés, old unimpaired o impaired, respectivamente). Nosotros preferimos no hacer esta distinción ya que, justamente, quisimos describir cambios que se dan en el envejecimiento. Las ratas viejas siempre son poblaciones heterogéneas. Como tal, la dispersión de algunos de nuestros datos cognitivos es mayor en el caso de las ratas viejas, con respecto a las jóvenes. De haber dividido al grupo de viejas, no habríamos podido distinguir cuál de los 2 grupos representaba cambios relacionados al envejecimiento. En realidad, observamos que nuestras ratas no se segregan espontáneamente en 2 grupos, sino son más bien un continuo desde las más dañadas

cognitivamente a las menos dañadas. Cualquier subdivisión habría estado basada en un límite arbitrario.

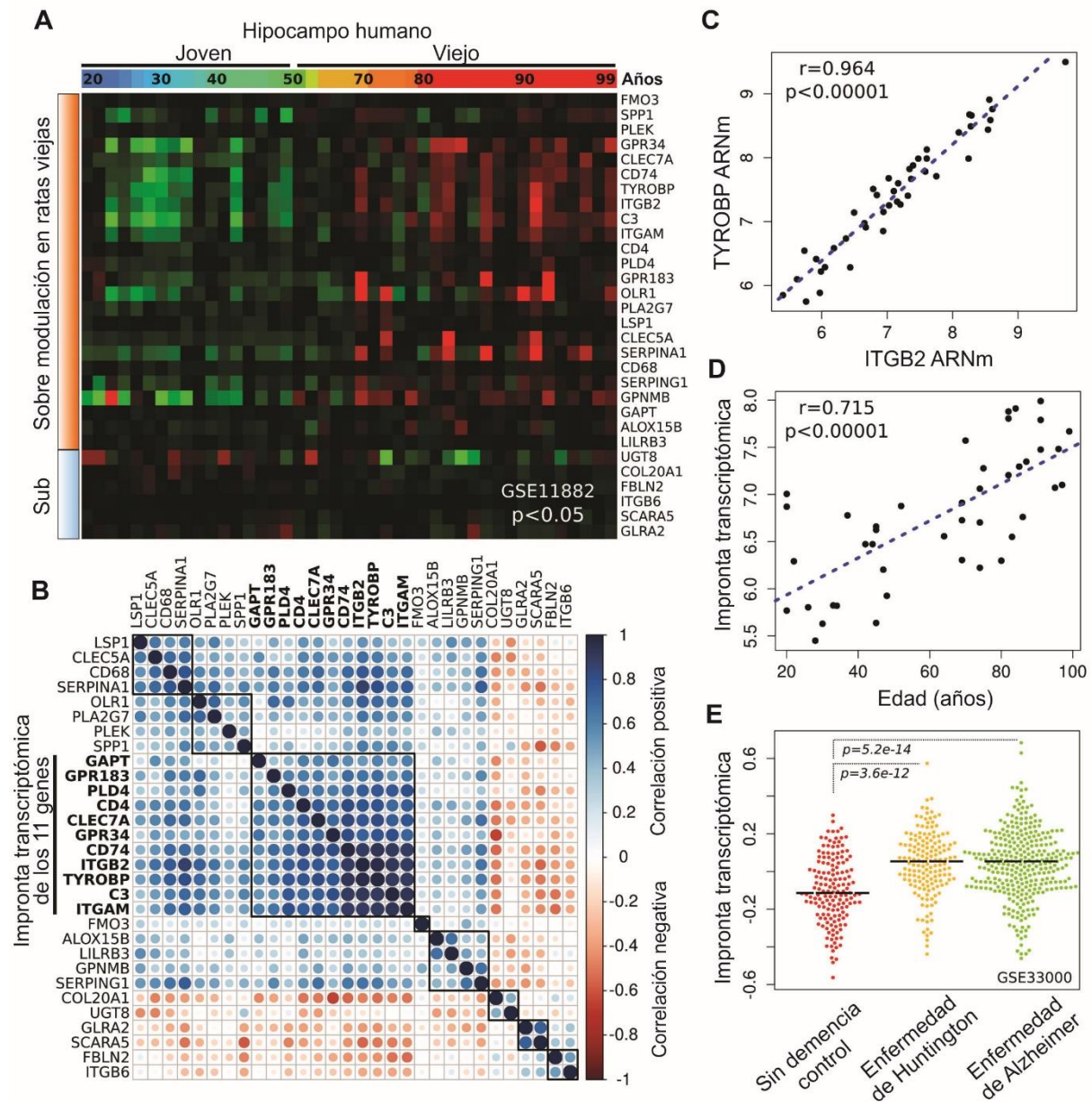


Figura 12. Impronta transcriptómica de los 11 genes desregulados con el envejecimiento a lo largo de las especies. **A.** Mapa de calor de los 30 genes DE con el envejecimiento en el hipocampo humano y de ratas. **B.** Matriz de correlación de los 30 genes desregulados. Nótase el cluster de 11 genes que demuestra el más alto grado de correlación (la impronta de los 11 genes). La intensidad del color azul oscuro denota alta expresión mientras que el diámetro del círculo es proporcional al valor de correlación entre el par de genes en cuestión. **C.** Correlación de expresión entre Tyrobp e Itgb2 en el hipocampo humano. **D.** Correlación de expresión de los 11 genes relacionados al envejecimiento en el hipocampo humano. **E.** Expresión de los 11 genes en el hipocampo de humanos ancianos sanos y pacientes de enfermedades neurodegenerativas.

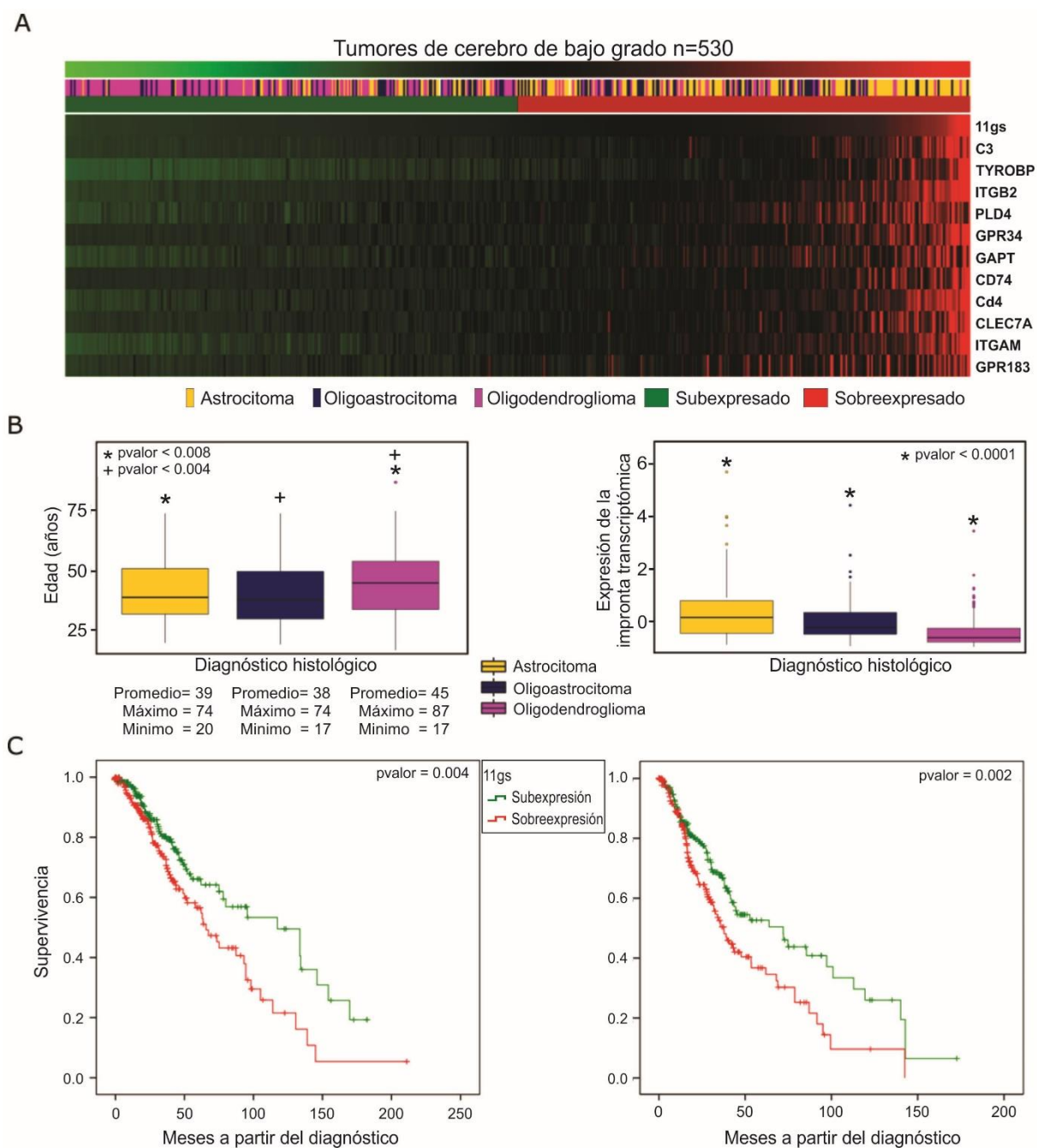


Figura 13. Expresión de los 11 genes en tumores de bajo grado. La expresión promedio de los 11 genes de la impronta fue utilizada para agrupar a las muestras en 'alta expresión' y 'baja expresión'. En los paneles **A** y **B** observamos la asociación significativa entre astrocitomas y tumores de 'alta expresión', así como la asociación de oligodendrogliomas con tumores de 'baja expresión'. **C.** Las curvas de sobrevida indican un peor pronóstico para el grupo de tumor con 'alta expresión'.

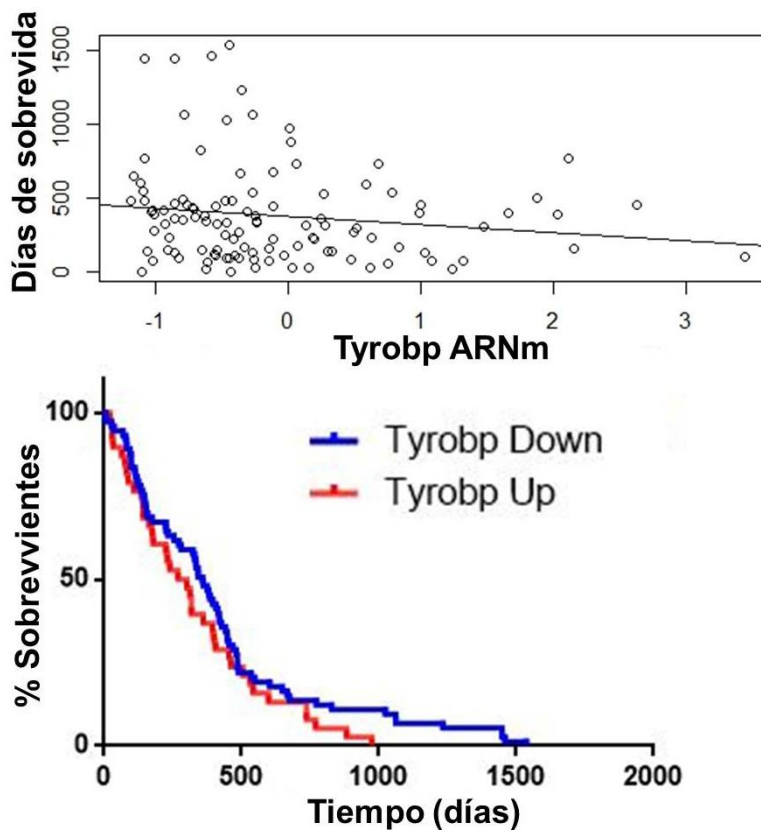


Figura 14. La sobreexpresión de Tyrobp está asociada a una menor sobrevida en pacientes con glioblastoma. A. Curva de correlación entre la sobrevida y la expresión del ARNm para Tyrobp. **B.** Curva de sobrevida para pacientes de glioblastoma con baja o alta expresión de Tyrobp. *Fuente: base de datos de microarreglos para pacientes de glioblastoma (TCGA).*

La reactividad inmune y los procesos inflamatorios incrementan con el envejecimiento en el cerebro [Lucin y col., 2009], con la microglia jugando un rol central en esta disregulación inmune [Luo y col., 2010; Norden y col., 2013]. La inmunidad innata dentro del SNC está promovida básicamente por la microglia residente. Estas células microgliales son esenciales para la vigilancia inmune y median respuestas coordinadas entre el sistema inmune y el cerebro. Con el envejecimiento normal, la microglia desarrolla un fenotipo más reactivo. Por ejemplo, en muchos modelos de envejecimiento se han encontrado elevados niveles de citocinas proinflamatorias en el cerebro, así como una elevada expresión de receptores asociados a la inflamación en la microglia [Luo y col., 2010]. Existen amplias diferencias en la biología de la microglia entre animales jóvenes y viejos cuando el sistema inmune es desafiado y la microglia activada. En este contexto, la activación microglial es amplificada y prolongada en cerebros viejos, en comparación con los jóvenes. Esta activación microglial conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias que exacerban la neuroinflamación, contribuyendo al deterioro cognitivo [Streit y col., 2004; Perry y col., 2010; Jiang y col., 2012]. Nuestros datos son consistentes con estas alteraciones y demuestran que en ratas viejas hembra hay una activación significativa de microglia reactiva en el hipocampo.

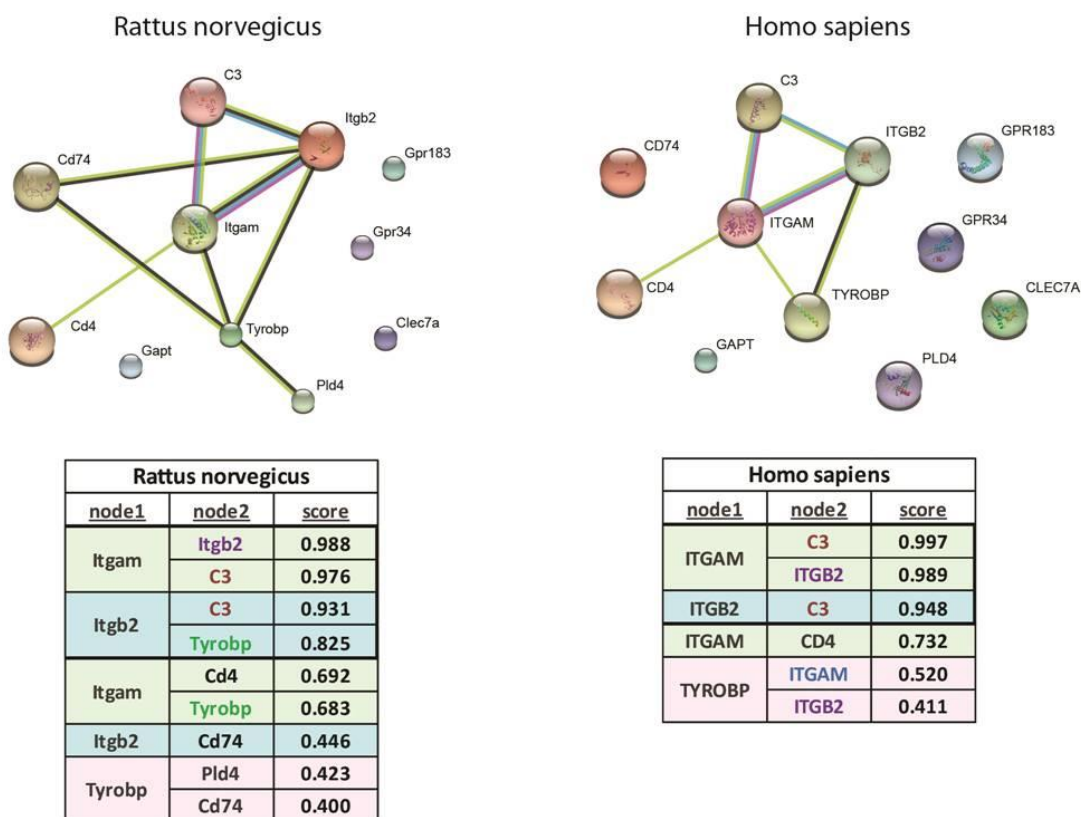


Figura 15. Interacciones biológicas entre las proteínas codificadas por los miembros de la impronta transcriptómica. Se utilizó el software bioinformático online String 10.0 (<http://stringdb.org>) para evidenciar interacciones entre los 11 genes en ratas (izquierda) y humanos (derecha), tomando información de bases de datos públicas. Los nodos pequeños indican proteínas cuya estructura 3D es desconocida, mientras que los nodos grandes se refieren a proteínas cuya estructura 3D es conocida o al menos está predicha. En STRING, cada interacción proteína-proteína está anotada con un score, el cual indica confianza. Los scores van del 0 al 1, siendo el 1 la mayor confianza posible.

Cambios de expresión génica en el hipocampo viejo. En roedores macho, el envejecimiento y, en menor medida, déficits en la memoria, han sido asociados a cambios en la expresión génica del hipocampo [Blalock y col., 2003; Verbitsky y col., 2004; Rowe y col., 2007; Burger y col., 2008]. Estas diferencias consistieron mayormente en la sobreexpresión de genes en ratones macho de mediana edad (15 meses) comparados con jóvenes de 2 meses [Verbitsky y col., 2004]. En el CA1 de ratas viejas macho se encontró que 233 genes fueron DE con el envejecimiento, 60% sobreexpresados y 40% subexpresados [Blalock y col., 2003]. En el hipocampo de nuestras ratas hembra, 61% de los 210 transcritos DE en los animales viejos estuvieron subexpresados, lo cual sugiere que en el hipocampo de animales muy viejos prevalece la subexpresión de genes en general. Por lo tanto, en lo que respecta a la proporción de genes sobre y subexpresados, hay un impacto

diferente del envejecimiento sobre animales macho y hembra. Si bien esta tendencia debería ser confirmada por estudios futuros, esta observación concuerda con estudios previos hechos en ratas [Sanguino y col., 2006] y en humanos [Berchtold y col., 2008].

Nuestro análisis de enriquecimiento de los 210 genes DE con el envejecimiento reveló que existe un grupo de genes comúnmente desregulados con el envejecimiento en ratones macho y en ratas. Observamos que en ratones macho viejos el hipocampo fue la región con el mayor número de genes DE que también estuvieron presentes en nuestra lista de 210 genes, en nuestras ratas viejas.

Como se mostró antes, la reducción con el envejecimiento de la neurogénesis en el hipocampo es notable. No obstante, este cambio fenotípico no se vio reflejado en el secuenciamiento de ARN, donde no encontramos genes desregulados relacionados a neurogénesis. Al respecto, es posible que un N mayor hubiese permitido obtener significación estadística en la expresión diferencial de este tipo de genes. Por otra parte, cabe mencionar que la neurogénesis está restringida al DG; por lo tanto es posible que de haber realizado el el secuenciamiento de ARN solamente en ARN proveniente del DG, habríamos encontrado diferencias significativas en genes relacionados a la neurogénesis.

Tomando en cuenta el score calculado con ESTIMATE, está claro que, al menos en el hipocampo, el envejecimiento de nuestras ratas viejas está asociado fuertemente con una desregulación de genes inmunes, particularmente aquellos relacionados al procesamiento antigénico vía MHC II, respuesta inmune, adhesión celular y vías mediadas por integrinas. El principal elemento glial afectado del hipocampo viejo parece ser la microglia, en la cual la sobreexpresión de los genes Tyrobp y Cd11b puede ser crucial para la disfunción de la microglia en las ratas viejas [Zhang y col., 2013].

Genes relacionados al envejecimiento y respuesta inmune del hipocampo. Nuestros datos de el secuenciamiento de ARN muestran que varios genes involucrados en la respuesta inmune se sobreexpresan en el hipocampo de la rata vieja, entre ellos cabe mencionar a Tyrobp, Cd11b, C3, Cd18, Cd4 y Cd74.

La proteína TYROBP, también conocida como DAP-12 o KARAP es clave en la regulación del sistema inmune. TYROBP actúa como una proteína adaptadora que participa en las señales de numerosos receptores celulares. Esta participación juega un rol importante en la transducción de señales en células dendríticas, osteoclastos, macrófagos y microglia. En este marco, TYROBP sirve como un conector del 'sensoma microglial', en donde se concentran numerosas conexiones moleculares [Hickman y col., 2013]. La pérdida de función de Tyrobp causa la enfermedad de Nasu-Hakola, la cual se caracteriza por demencia

progresiva y quistes multifocales en hueso [Xing y col., 2015]. Además, Tyrobp se sobreexpresa significativamente en el cerebro de pacientes con AD [Zhang y col., 2013]. En el SNC, la expresión de Tyrobp predomina en la microglia, promoviendo su actividad fagocítica, la cual es la responsable del aclaramiento de depósitos β amiloides y de neuronas apoptóticas [Xing y col., 2015]. Por lo tanto, la sobreexpresión de Tyrobp puede resultar en desbalances en los procesos neuroinflamatorios. Por otra parte, nuestro descubrimiento de la relación entre la sobreexpresión de Tyrobp y la malignidad de glioblastomas será continuado por investigaciones futuras.

La integrina CD11B (también conocida ITGAM) es una subunidad proteica que forma la integrina heterodimérica alpha-M beta-2 (AMB2), mejor conocida como Receptor del Complemento 3 (CR3) [Ling y col., 2014]. Este receptor regula positivamente las vías de señalización del receptor el TLR4 en células dendríticas [Ling y col., 2014]. En el cerebro, la integrina Cd11b se expresa en la microglia y es el sello distintivo de su activación [Block y col., 2007]. Por otra parte, Cd11b ha sido implicada recientemente en la muerte de neuronas dopaminérgicas por inflamación [Pei y col., 2007].

Más aún, se ha demostrado que CD11B y TYROBP están involucradas en la inducción de muerte neuronal durante el desarrollo en el hipocampo. Asimismo, se ha visto que la microglia utiliza mecanismos de la inmunidad innata para inducir apoptosis de neuronas comprometidas a muerte celular durante el desarrollo [Wakselman y col., 2008].

Una impronta transcriptómica de 11 genes conservada a lo largo de las especies. El análisis *in silico* de muestras humanas de hipocampo fue realizado para identificar genes en común con los 210 DE en nuestras ratas viejas. Del análisis se obtuvieron 30 genes DE en común, de los cuales 11 mostraron un grado de correlación máximo en una matriz de correlación, lo cual sugiere que están involucrados en un mismo proceso biológico.

Cuando evaluamos la expresión de estos 11 genes en AD y HD, encontramos una asociación positiva significativa. Interessantemente, un análisis funcional de los 11 genes indicó que la sobreexpresión de estos está asociada a una activación de la respuesta inmune y a unión de proteínas a MHC, lo cual coincide con los términos ontológicos representados por el análisis de enriquecimiento funcional de los 210 genes. Este descubrimiento implica que estos 11 genes se sobreexpresan en el hipocampo de humanos y roedores y, ya que están asociados a la activación inmune, hipotetizamos que la expresión de esta impronta de 11 genes se relaciona a un mecanismo disfuncional del sistema inmune en el hipocampo durante el envejecimiento.

Algunos de estos 11 genes han sido discutidos arriba. Otros, como *Pld4*, *Gpr183*, *Glec7a*, *Gpr34*, y *Gapt* se discutirán aquí. La fosfolipasa D4 (*Pld4*) pertenece a la familia de las fosfolipasas D [Terao y col., 2013]. Las fosfolipasas D juegan un importante rol patofisiológico en la progresión de enfermedades neurodegenerativas, primariamente a través de su capacidad de transducir señales en procesos celulares indispensables, tales como la reorganización del citoesqueleto y el tráfico vesicular [Lindsley y col., 2012]. La desregulación de la PLD por la α -sinucleína ha mostrado conllevar a una pérdida de neuronas dopaminérgicas en mamíferos. En efecto, la α -sinucleína es capaz de desinhibir la PLD, lo que podría contribuir a un fenotipo parkinsoniano [Peng y col., 2012]. La actividad anormal de la PLD también ha sido estudiada en AD. De esta manera, se ha observado que la PLD interacciona con presenilina 1, el principal componente del complejo de la γ -secretasa, responsable del clivaje enzimático la proteína precursora de amiloide [Peng y col., 2012].

La GPR 183, también conocida como EBI2, es una proteína codificada por el gen *Gpr183* en humanos [Rosenkilde y col., 2006]. La GPR183 guía a los linfocitos B dentro de los nodos linfáticos y su expresión se incrementa durante la activación de células B, después de la activación del receptor de células B y la estimulación de CD40 [Pereira y col., 2009].

El CLEC7A pertenece a una clase de receptores involucrados en la inmunidad antifúngica, pero también juega roles importantes en la respuesta inmune ante otros patógenos como bacterias, virus y nematodos [Drummond y col., 2011].

La GAPT, es una proteína transmembrana adaptadora involucrada en la transducción de señales y la comunicación celular. En humanos, es codificada por el gen *GRB2* [Matuoka y col., 1992; Lowenstein y col., 1992].

Hasta el momento no se ha descrito experimentalmente la interacción entre estas 11 proteínas en procesos inflamatorios, sin embargo, nuestro descubrimiento predice dicho proceso (Fig 15) y será de interés estudiarlo en detalle en el futuro.

Capítulo 4. Estudios sobre terapia génica neuroprotectora a corto plazo con IGF-I en el hipocampo de la rata vieja

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *European Journal of Neuroscience*.

Pardo J, Uriarte M, Cónsole GM, Reggiani PC, Outeiro TF, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *Eur J Neurosci*. 2016 Aug;44(4):2120-8.

4.1. Resumen

En las ratas, la memoria y la capacidad de aprendizaje se deterioran con el envejecimiento, lo cual la convierte en un modelo animal adecuado para evaluar estrategias terapéuticas de potencial valor para corregir déficits cognitivos asociados al envejecimiento. Una de estas estrategias incluye terapéuticas con factores neurotróficos, tales como el IGF-I, una molécula neuroprotectora. En este trabajo, implementamos terapia génica icv de corto plazo con IGF-I en ratas SD hembra de 28 meses, y analizamos el efecto de la terapia sobre la memoria espacial en el BM. También estudiamos la morfometría del hipocampo con técnicas de estereología no sesgada. Utilizamos adenovectores que expresan el gen del IGF-I de rata o de la DsRed, como control. Al final del estudio los niveles de IGF-I fueron significativamente mayores en el grupo experimental con respecto al control. Después del tratamiento, el grupo IGF-I mostró una mejora significativa en la memoria espacial. En el DG, el grupo IGF-I mostró un mayor número de neuronas inmaduras. Además el tratamiento incrementó la arborescencia proximal de astrocitos en el SR. Este estudio consistió en el primer trabajo de terapia génica con IGF-I para mejorar la memoria espacial y demostró ser eficaz revelando cierta restauración en parámetros característicos de las ratas viejas.

4.2. Objetivo específico

Realizar terapia génica de corto plazo con un adenovector IGF-I de primera generación en el cerebro de la rata senil (28 meses) para mejorar su memoria espacial y estudiar el impacto de dicha terapia sobre la neurogénesis hipocampal y la ramificación y longitud total de astrocitos hipocampales.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1 Vectores adenovirales

RAd-IGF-I. Un RAd portador del gen para el IGF-I de rata (gen provisto por Peter Rotwein, Oregon Health Sciences University) fue construido con el procedimiento descrito previamente en nuestro laboratorio [Hereñú y col., 2007]. El ADNc del IGF-I fue colocado bajo el control del pmCMV. El adenovirus fue purificado como se describió para el RAd-GFP en el capítulo 2 de este libro.

RAd-DsRed. Este adenovirus fue construido de una forma similar al mencionado arriba. El ADNc para DsRed fue colocado bajo el control del pmCMV.

4.3.2 Animales

Se utilizaron 22 ratas SD hembra de 28 meses. Veinte animales fueron divididos al azar en 2 grupos de 10 animales. El **grupo IGF-I**, recibió i.c.v. una inyección bilateral del RAd-IGF-I, y el **grupo DsRed**, recibió icv el RAd-DsRed. Durante el experimento, una rata fue descartada de cada grupo por problemas de salud. Dos ratas viejas adicionales fueron utilizadas para caracterizar la expresión de corto plazo del RAd-DsRed.

4.3.3. Diseño experimental

El día de la inyección del vector se definió como día experimental 0. Antes y 14 días después de este día se realizó una sesión de BM. Luego, el día experimental 18 se extrajo LCR y se procedió a la eutanasia de los animales por perfusión intracardiaca (**Fig. 16B**). Dos ratas viejas fueron inyectadas con RAd-DsRed, 2 días después de la inyección se procedió a la eutanasia de los animales para evaluar la expresión de la DsRed.

4.3.4. Cirugías estereotáxicas

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (40 mg/kg; ip) y xilacina (8 mg/kg; im) y colocadas en un aparato estereotáxico. La inyección en los ventrículos laterales fue realizada con una jeringa Hamilton de 10 µl de capacidad. Las coordenadas respecto al Bregma fueron: -0.8 mm anteroposterior, 4.1 mm dorsoventral and ± 1.5 mm mediolateral [Paxinos &

Watson, 1998]. Las ratas fueron inyectadas bilateralmente con 8 μ l por lado de una suspensión con 10^{10} pfu del vector apropiado. Al día 18 post-inyección se extrajo LCR y conservó a -80 °C hasta el dosaje de los niveles de IGF-I. El LCR fue obtenido de la cisterna magna por punción con una jeringa hipodérmica, como ya hemos documentado previamente en trabajos de nuestro laboratorio [**Nishida y col., 2011**]. Con este procedimiento obtuvimos, en promedio, 50 μ l de LCR.

4.3.5. Evaluación de memoria espacial

Para evaluar la memoria espacial utilizamos el BM.

Al comienzo del experimento, las ratas fueron habituadas a las cajas de escape y de salida colocándolas en cada una de estas por 180 s.

Antes y después de la inyección del vector, utilizamos un protocolo abreviado de 4 días dado que la terapia génica con IGF-I se evaluó a corto plazo. Dicho protocolo consistió en un periodo de aprendizaje de 3 días (2 ATs por día), seguidos de un PT, el cual fue realizado un día después de la serie de ATs. Los ATs y PTs duraron 60 s. Para realizar un estudio más detallado, además de los parámetros definidos en el **capítulo 2**, para este trabajo estudiamos tres parámetros más:

- Frecuencia de exploración de la región meta: para un PT dado, la suma de las exploraciones de los agujeros -1,0 y 1 dividida por 3.
- Frecuencia de exploración de la región no meta: para un PT dado, la suma de las exploraciones de todos los agujeros (2 a 10 y -2 a -9), excepto -1,0 y 1, dividida por 17.
- Actividad exploratoria total por agujero: la suma de las exploraciones en todos los agujeros dividida por 20.

4.3.6. Procesamiento de cerebros

Al día de la eutanasia los animales fueron anestesiados con ketamina y xilacina como se describió arriba (ver **4.3.4.**), se les extrajo LCR y se perfundieron con formol al 4% en buffer PB. Los cerebros fueron removidos y se post-fijaron en formol al 4% en buffer PB por un día a 4°C. Luego, los cerebros fueron conservados en solución criopreservadora a -20°C hasta ser usados. Para la IHQ, los cerebros se cortaron de forma coronal en secciones de 40 μ m con un vibrátomo.

4.3.7. Inmunohistoquímica

La IHQ se realizó en secciones en flotación. Para cada animal, las secciones fueron procesadas con un anticuerpo primario policlonal hecho en cabra anti-DCX (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8066) o con un anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) (dilución 1:500, Sigma, Saint Louis, Missouri). Brevemente, después de incubar las secciones por un día a 4°C con anticuerpo primario, se las incubó con anticuerpos biotinilados generados en caballo anti-cabra (dilución 1:1000; Vector Laboratories Cat# BA-9500) o anti-ratón (1:300, BA-2000, Vector Labs.) por 2 horas. Luego se incubaron con complejo avidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:500; Vector Laboratories Cat# PK-6100) por 90 mins y se revelaron con DAB. Posteriormente, las secciones se contracoloraron con Violeta de cresilo como se describió en **3.3.4**.

4.3.8. Morfometría del hipocampo

El análisis de imágenes, la estimación de volumen y el análisis de neuroblastos fue descrito en el *capítulo 3*.

El estudio de la morfología de los astrocitos reactivos a GFAP (GFAPir) fue realizado en el SR [Paxinos and Watson, 1998]. El número total de células fue estimado utilizando una versión modificada del método del fraccionador óptico [West, 1993]. Las estimaciones del número de células bilateral fueron calculadas con la fórmula $N = RQR.1/ssf.1/asf.1/tsf$. Las células que cayeron dentro del área de la plantilla fueron contadas. Las células que hicieron contacto con la líneas de inclusión fueron tenidas en cuenta para el recuento, no siendo así el caso para las que hicieron contacto con la línea de exclusión. Para este recuento, $ssf=1/6$, $tsf=1$ y $asf=1/10$. $N=6$ ratas por grupo de animales. El recuento se realizó a un aumento de 1000X. De esta manera, se estimó el número total de astrocitos GFAPir en el SR de cada rata.

En aras de estudiar la complejidad de las prolongaciones de los astrocitos, estos fueron sometidos al análisis de Sholl [Sholl, 1953]. Esta técnica consiste en superponer una plantilla con círculos concéntricos distribuidos a una distancia d (5 μm) centrados en el cuerpo de la célula. Se contabilizó el número 'i' de intersecciones de las prolongaciones con los anillos (un índice de complejidad de arborescencia) y la longitud total de las prolongaciones fue estimada por la suma de los valores i de cada anillo multiplicadas por $d=5$ (la distancia entre anillos).

Para este análisis de Sholl, se tomaron imágenes del SR a 1000X a lo largo de las 8 secciones coronales representativas del hipocampo. En cada rata (6 por grupo), 160 astrocitos fueron elegidos al azar. La longitud total de las prolongaciones y su complejidad de arborescencia a cada distancia del cuerpo celular fue promediada para cada rata y este resultado fue utilizado para el análisis estadístico entre los grupos.

4.3.9. Dosaje de IGF-I

Los niveles de IGF-I en LCR se dosaron como ya hemos descrito en nuestro laboratorio [Hereñú y col., 2006]. El IGF-I fue extraído de 20 µl de LCR por crioprecipitación etanol-ácida y se procedió a su radioinmunoensayo (RIA) utilizando el anticuerpo UB2-495 de L. Underwood y J.J. Van Wyk, el cual es distribuido por el Programa de Distribución de Hormonas del Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK, Bethesda, Maryland, EEUU). El IGF-I recombinante humano (rh IGF-I; Chiron Corp., Emeryville, CA) fue utilizado como marcador y ligando no marcado.

4.3.10. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software Sigma Plot v.11. Los datos estereológicos y de comportamiento están presentados como la media \pm error estándar. Las comparaciones de los ATs entre los grupos fueron realizadas con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Cuando el ANOVA fue significativo, el test post-hoc de Holm-Sidak fue empleado para evaluar diferencias significativas entre las medias. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$. Además, algunos parámetros de los PTs fueron analizados con test-t de Student.

El test-t de Student fue empleado para el análisis estadístico de los datos estereológicos y los valores de IGF-I.

4.4. Resultados

4.4.1 Cambios cognitivos

Latencia. Antes del tratamiento, la latencia cayó significativamente a tasas comparables en ambos grupos (ANOVA de dos vías RM: factor tratamiento: $GL=1$; $F= 0,0419$; $p = 0,840$;

factor trial: $GL=13$; $F= 3,654$; $p < 0,001$; interacción tratamiento x trial: $GL=13$; $F=1,068$; $p=0,389$) desde el AT1 al AT6 y fue similar en el PT pre-tratamiento (**Fig 16C**). Las latencias después del AT7 comenzaron a niveles más bajos que antes del tratamiento (AT1) en ambos grupos (test post-hoc Holm-Sidak test $p=0.008$) y tendieron a ser menores en el grupo DsRed, aunque esta tendencia no fue significativa (**Fig 16D**). Las latencias del PT post-tratamiento fueron similares para ambos grupos.

Errores. En las series de AT pre-tratamiento, los errores disminuyeron significativamente a lo largo del tratamiento (ANOVA de dos vías RM: factor tratamiento: $GL=1$; $F= 1,956$; $p = 0,181$; factor trial: $GL=13$; $F= 3,837$; $p < 0,001$; interacción tratamiento x trial: $GL=13$; $F=1,235$; $p=0,257$) (**Fig. 16E**). El número de errores post-tratamiento varió erráticamente desde el AT7 al AT12 en el grupo DsRed pero permaneció bajo en el grupo IGF-I, siendo esta diferencia significativa para los AT11 y AT12 (Holm-Sidak pos-hoc test $p= 0.004$ y $p= 0.038$, respectivamente) (**Fig. 16F**).

Exploración de agujeros. Como se esperaba, la exploración de agujeros mostró una campana centrada en el agujero 0 similar para ambos grupos en el PT pre-tratamiento (día experimental -1) (**Fig 17A**). Después del tratamiento, la exploración del agujero 0 fue significativamente mayor para el grupo IGF-I que para el DsRed (test de Mann Whitney $p=0.015$), mientras que ambos grupos mostraron una exploración similar para los demás agujeros. (**Fig 17B**).

La actividad exploratoria total por agujero disminuyó significativamente después del tratamiento en ambos grupos (test-t de Student pareado para ambos grupos antes y después del tratamiento; $p<0.05$). La actividad exploratoria de la región meta (GS) no cambió después del tratamiento (**Fig 18**).

Distancia recorrida. La terapia génica con IGF-I no tuvo ningún impacto sobre la distancia recorrida por los animales de ambos grupos (test de Student para PT pre y post tratamiento, $p > 0.40$) (**Fig. 19**).

4.4.2. Expresión de los transgenes IGF-I y DsRed

Dos días después de la inyección del RAd-DsRed se observó una intensa expresión de la DsRed en la capa de células endoteliales de todos los ventrículos cerebrales (**Fig. 20 A-D**). Dieciocho días después de la inyección se observó expresión transgénica pero mucho más débil que en el caso anterior (**Fig. 20 E-H**). Al día experimental 18, los niveles de IGF-I en

LCR fueron significativamente mayores (test-t de Student, $p < 0.001$) en el grupo IGF-I (**Fig. 20I**).

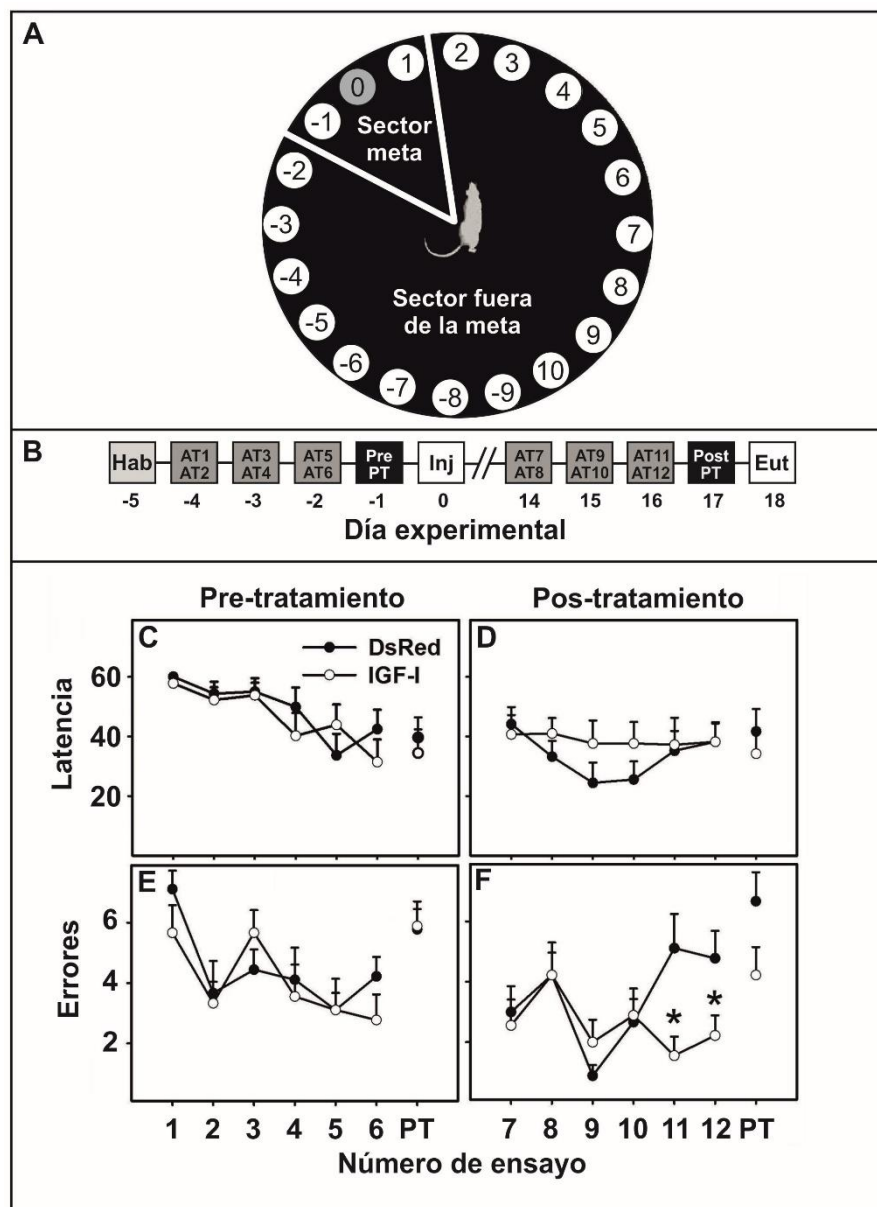


Figura 16. Efecto de la terapia génica con IGF-I en el desempeño de las ratas viejas en el BM. Panel A, se muestra el laberinto visto desde arriba. **Panel B,** muestra el diseño experimental de este estudio. **Paneles C y D,** muestran latencias en ATs y en PTs antes y después del tratamiento, respectivamente en los grupos DsRed e IGF-I. **Paneles E y F,** muestran latencias en ATs y en PTs antes y después del tratamiento, respectivamente en los mismos grupos. N=9 para ambos grupos. Hab, habituación; AT, ensayo de adquisición; Pre PT, ensayo de prueba antes del tratamiento; Inj., inyección de vector; Post PT, ensayo de prueba post tratamiento; Eut., eutanasia. * $P < 0,05$ vs. el grupo DsRed.

4.4.3. Cambios morfométricos en el hipocampo dorsal

Los volúmenes de SR y DH no mostraron diferencias significativas (test t de Student, $p = 0,148$ y test de Mann Whitney test, $p = 0,686$, respectivamente) entre los grupos experimentales (**Fig. 21**).

El grupo IGF-I mostró una diferencia significativa (test t de Student, $p = 0,046$) en el número de células DCXir en el DG, en comparación con las ratas DsRed (**Fig 22 A-C**) mientras que el número de células astrogiales GFAPir en el SR fue significativamente menor (test t de Student, $p = 0,025$) en el grupo IGF-I (**Fig 22 D-H**).

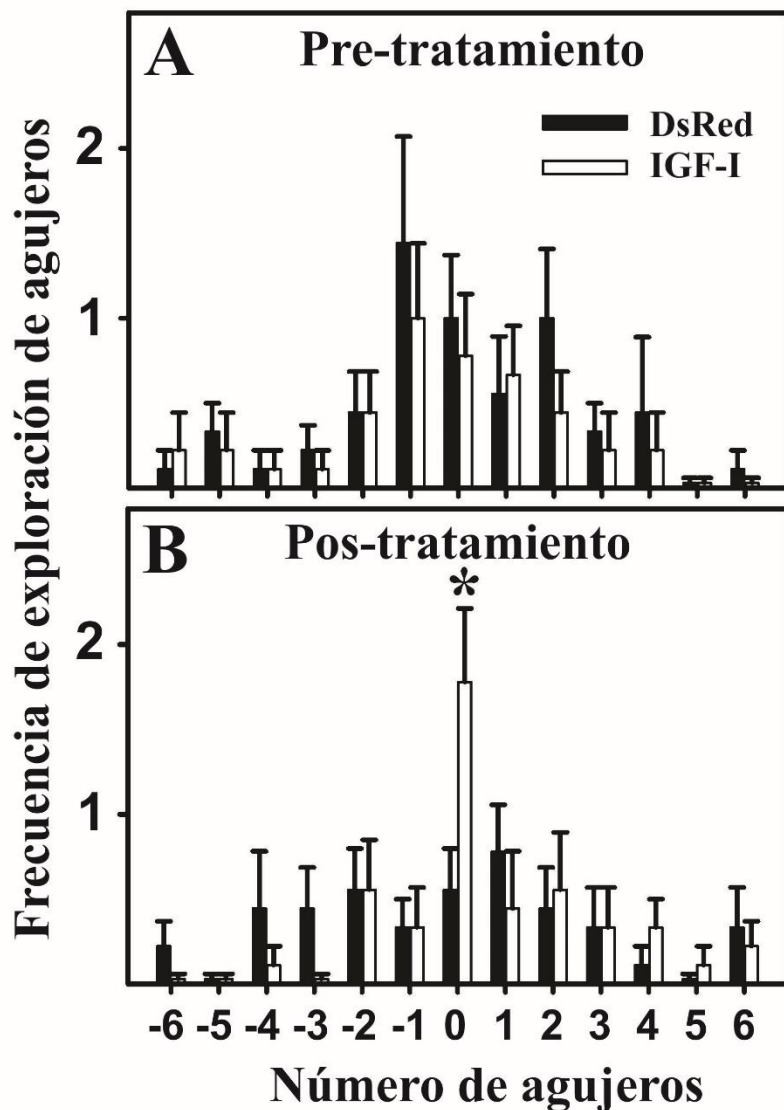


Figura 17. Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre la exploración de agujeros. Antes del tratamiento (A), ambos grupos mostraron una campana similar centrada sobre el agujero 0. Después del tratamiento (B), la frecuencia exploratoria para el agujero meta fue significativamente mayor para el grupo IGF-I. N=9 ratas para ambos grupos. *P<0,05.

Encontramos una diferencia significativa en la complejidad de arborescencia a 5 y 10 μm del cuerpo de los astrocitos (test de Student $p=0.01$ y $p=0.029$ para 5 μm y 10 μm , respectivamente). Además, las intersecciones a las distancias de 15 y 20 μm mostraron una clara tendencia hacia un aumento de la arborescencia para las ratas del grupo IGF-I (test-t de Student $p=0.075$ y $p=0.083$ para 15 μm and 20 μm , respectivamente).

Por último, se observó una tendencia hacia un incremento en la longitud media de los astrocitos en el grupo IGF-I (test t de Student $p=0.058$) (**Fig. 23**).

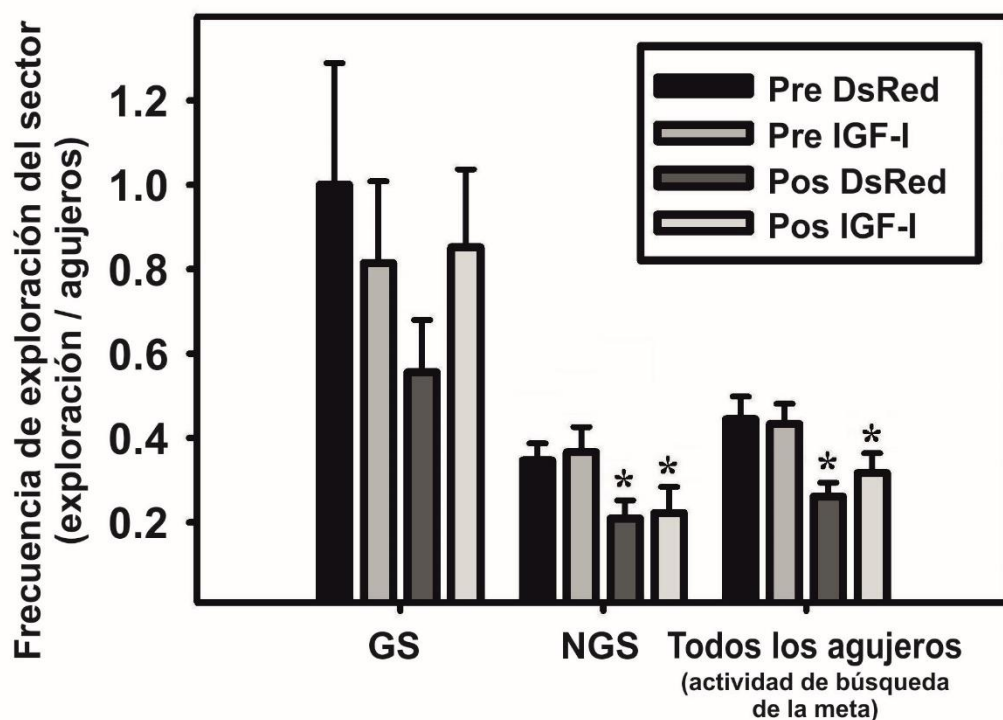


Figura 18. Efecto de la terapia génica con IGF-I en la frecuencia de exploración total y de la región meta. Si bien la terapia génica impidió la caída en la exploración de la región meta después del tratamiento, esta diferencia no fue significativa. GS, zona meta; NGS, zona no meta. Todos los agujeros, los 20 agujeros de la plataforma tomados como un sólo sector. Las comparaciones fueron realizadas versus el desempeño pre-tratamiento del grupo experimental en cuestión.* $P < 0.05$; $N = 9$ para ambos grupos.

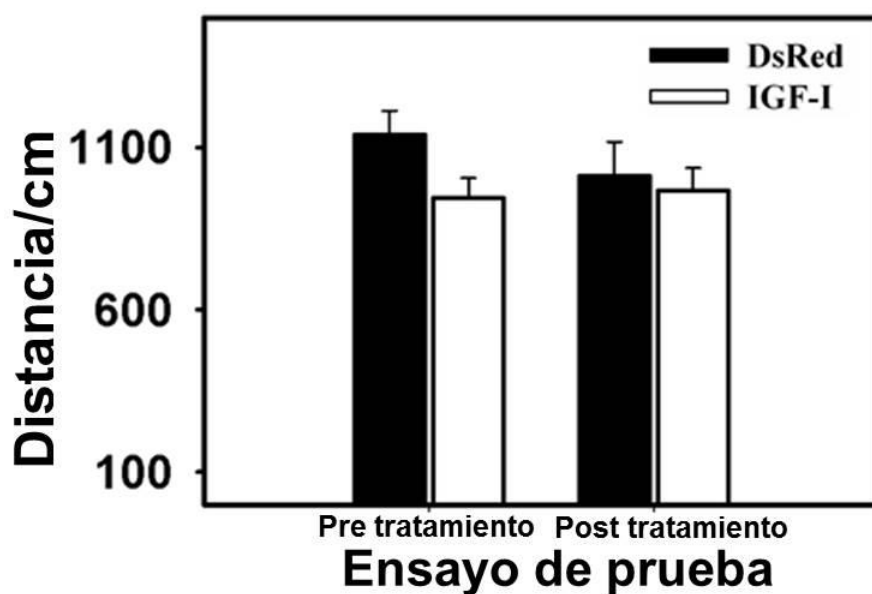


Figura 19. Distancia recorrida.

Observamos que no hubo cambios en las distancias recorridas en los PTs

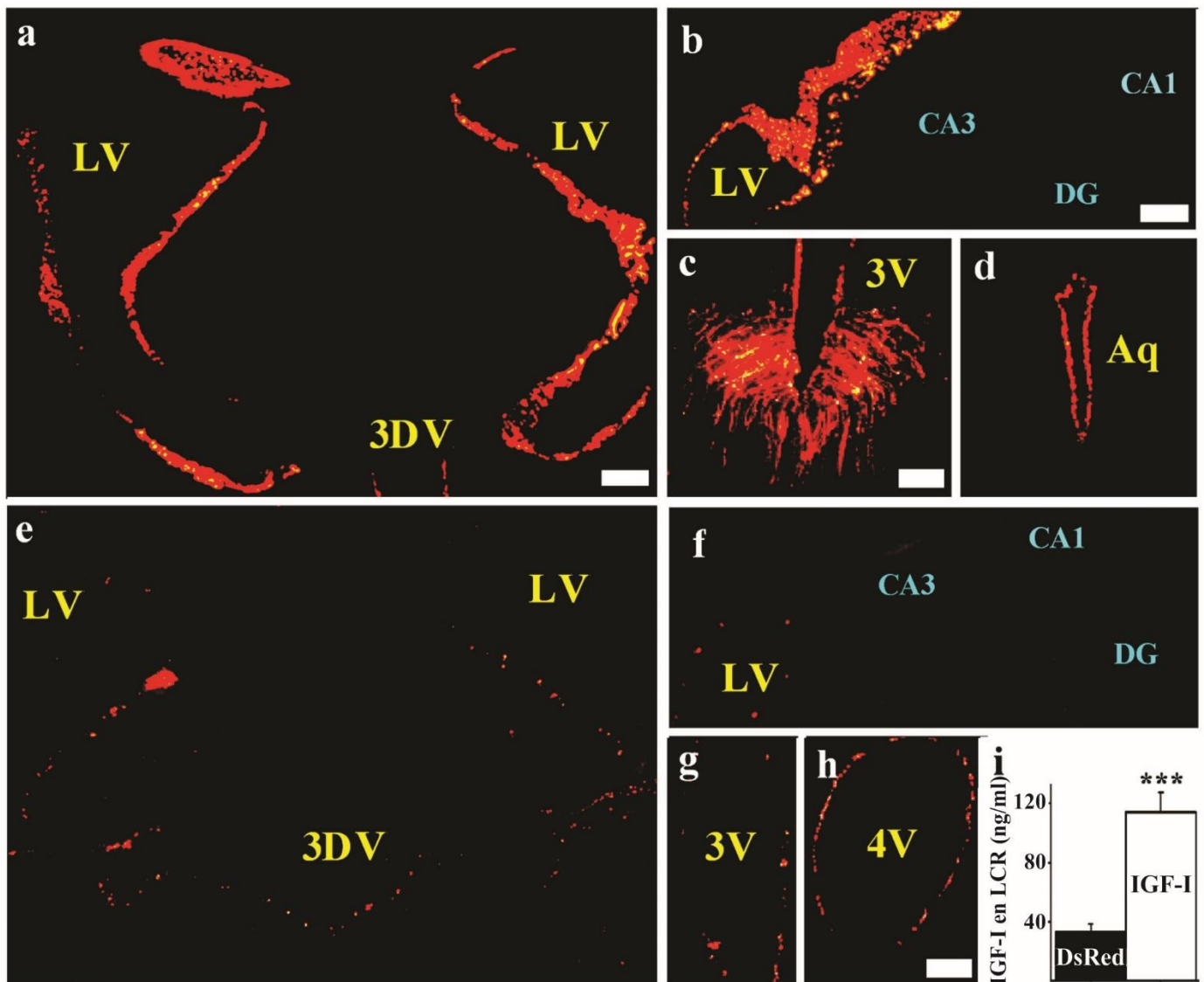


Figura 20. Expresión transgénica. Los paneles A, B, C y D muestran fluorescencia roja de la DsRed en células ependimarias de ratas inyectadas 2 días antes con RAD-DsRed. Los paneles E, F, G y H muestran la expresión de DsRed al final del experimento (día 18). El panel I muestra los niveles de IGF-I en LCR al día 18 en ambos grupos experimentales. En el panel I, N=5 y 4 para los grupos DsRed e IGF-1, respectivamente. LV, ventrículo lateral; 3V, tercer ventrículo; 3DV, tercer ventrículo dorsal; Aq, acueducto; 4V, cuarto ventrículo; CA1, CA3 and DG se refieren a las regiones del hipocampo. Escala para A,E=200µm, escala para B,F=150µm, escala para C,D=100µm, escala para G,H=50µm.

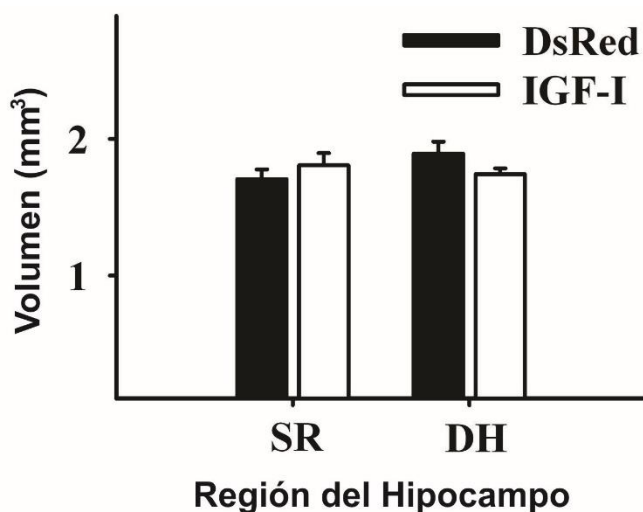


Figura 21. Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre el volumen de SR y DH. El número de especímenes evaluados fue de 4 para ambos grupos. No se detectaron diferencias significativas.

4.5 Discusión

El hipocampo de la rata presenta, con el envejecimiento, cambios complejos en su organización funcional pero no presenta pérdida de neuronas maduras [Rapp & Gallagher, 1996]. Sin embargo, se ha observado una disminución de las neuronas inmaduras. En efecto, la neurogénesis hipocampal, importante para ciertos tipos de memoria, cae significativamente en ratas viejas [Lichtenwalner y col., 2001]. Una causa posible de la reducción de la neurogénesis puede ser, en parte, la reducción de los niveles séricos y cerebrales de IGF-I con el envejecimiento [Sonntag y col., 1980]. Además de la onocida actividad neurogénica, el IGF-I ejerce numerosas acciones modulatorias sobre el cerebro durante toda la vida [Fernandez & Torres-Alemán, 2012]. En este estudio elegimos la ruta endimaria para la transferencia del gen del IGF-I dado que la mayor parte del IGF-I usado por el SNC proviene de la circulación sanguínea [Carro y col., 2000, 2006b], de la cual es activamente transportado a través de los plexos coroides hacia el LCR, desde donde alcanza áreas específicas del cerebro por mecanismos aún no del todo claros [Guan y col., 1996, Carro y col., 2000]. Por lo tanto, la ruta endimaria es una vía razonable para realizar terapia génica con IGF-I, ya que emula la ruta fisiológica por la cual el IGF-I llega a las distintas estructuras cerebrales.

Elegimos implementar terapia génica icv con un vector adenoviral recombinante debido a que estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que estos vectores transducen muy eficientemente a las células endimarias [Hereñu y col., 2009].

El IGF-I recombinante liberado al LCR actúa sobre diversas estructuras cerebrales. En este trabajo decidimos estudiar la morfometría del hipocampo debido a que es una estructura clave para la formación de memoria espacial. Entre las regiones hipocampales, nos focalizamos en el estudio de las neuronas inmaduras y los astrocitos del DG y el SR, respectivamente. Estas regiones son particularmente vulnerables a degeneración en la AD y, en el caso del SR, se ha

observado que en ratas viejas hay una disminución en la densidad sináptica, el área de densidad post-sináptica y el número total de sinapsis [Li y col., 2009].

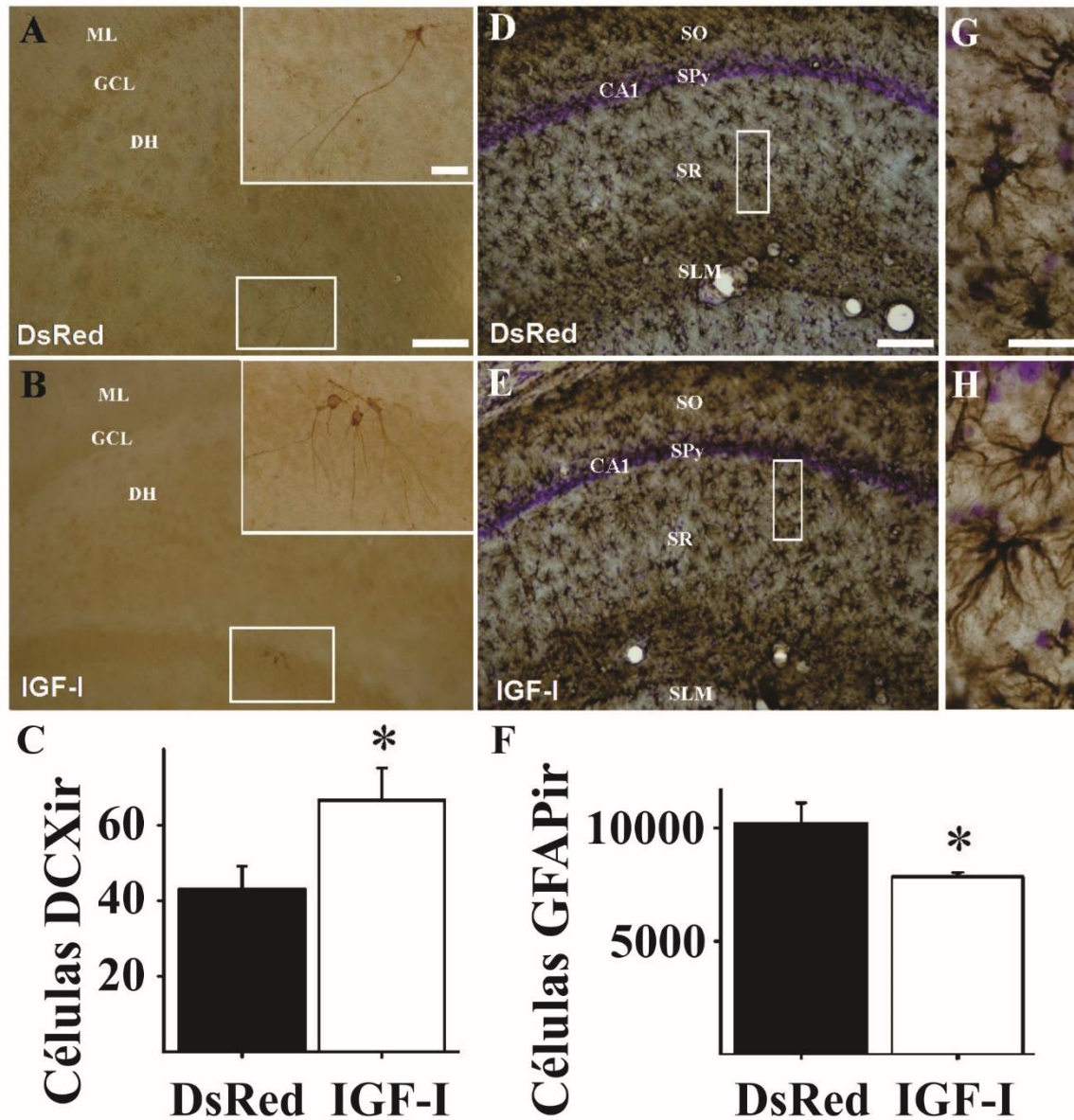
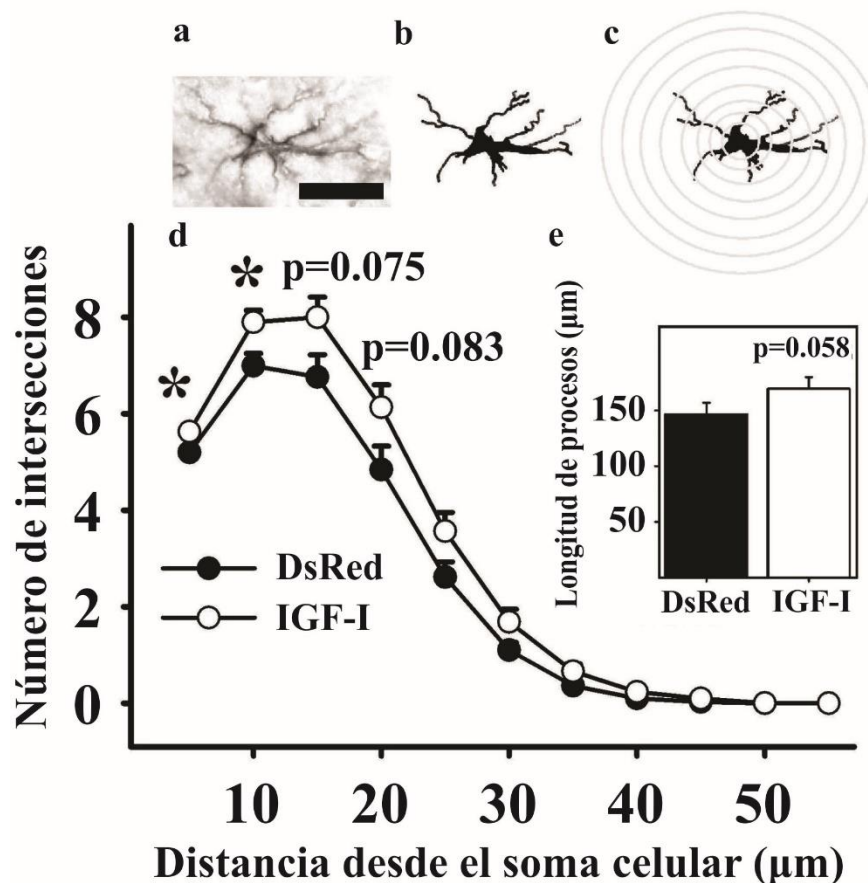


Figura 22. Expresión de DCX y GFAP en el hipocampo. Se muestran secciones coronales representativas de animales de los grupos DsRed e IGF-I. **A** y **B** para neuronas DCXir, **D** y **E** para células GFAPir. Los insets **G** y **H**, a la derecha de **D** y **E**, representan vistas en aumento de las áreas remarcadas en las respectivas imágenes. Los paneles **C** y **F** muestran gráficos que representan la estimación del número bilateral de células DCXir y GFAPir, respectivamente, en el DG y SR de ratas control y experimentales. N=6 para ambos grupos. ML, capa molecular, GCL, capa granular de células, DH, dentate hilus; SO, stratum oriens; SPy, stratum pyramidale; CA1, cornus ammonis 1; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum moleculare. Escala, 100 μ m, insets, 20 μ m.



El efecto más importante del tratamiento se observó en la exploración de agujeros, en donde el grupo IGF-I exploró más el agujero meta que el grupo control. Cabe destacar que ambos grupos experimentales exploraron de forma similar el resto de los agujeros, por lo que la terapia parece haber sido bastante específica a este respecto.

En el estudio descrito en el *capítulo 3* mostramos el deterioro de la memoria espacial y la disminución dramática de la neurogénesis en las ratas viejas, en el presente trabajo demostramos que la terapia génica con IGF-I ha sido restauradora de estos parámetros deteriorados por el envejecimiento.

Estudios de otros grupos concuerdan con los resultados de este trabajo. En ratas macho Brown Norway X Fischer 344 de 28 meses, se registró una reducción significativa del número de células 'recién nacidas' en el DG, así como una reducción del 60% de su diferenciación a neuronas [Lichtenwalner y col., 2001]. En este mismo estudio se demostró que la administración icv del péptido IGF-I a animales viejos restauró la neurogénesis hipocampal hasta un 300%. En otro trabajo [Åberg y col., 2000] se administró IGF-I periférico a ratas SD jóvenes hipofisectomizadas. Esto aumentó la neurogénesis (pero no la astrogénesis) en el DG, así como favoreció la diferenciación de células progenitoras hacia neuronas.

En otro trabajo [Markowska y col., 1998] en ratas seniles de 32 meses, se administró durante 28 días IGF-I icv con un minibomba osmótica implantada en un ventrículo lateral.

Este tratamiento incrementó el número de cruces a la plataforma oculta en el Laberinto de Morris. Este trabajo está en línea con nuestros resultados, ya que el cruce a la plataforma oculta en el Laberinto de Morris es equivalente a la cantidad de exploraciones en el agujero meta en el BM.

En nuestro estudio observamos que después del tratamiento la actividad exploratoria por agujero promedio cayó significativamente en ambos grupos experimentales. Esto podría reflejar desmotivación para escapar del laberinto, sin embargo, habiendo sido la sesión de aprendizaje corta en comparación con los protocolos del BM de los demás capítulos, es más probable que estos animales viejos hayan necesitado un período de aprendizaje más largo. De hecho, para los trabajos de los *capítulos 3 y 5*, los animales recibieron un aprendizaje más intenso y mostraron una actividad exploratoria notablemente mayor a la observada en los sujetos de este estudio.

En ratas se ha observado que a partir de los 13 meses existe una hipertrofia de los astrocitos y un moderado aumento de su número en el hipocampo [Lindsey y col., 1979]. En un estudio muy interesante, se observó que los astrocitos de animales viejos ese encuentran 'activados' y producen más GFAP y menos laminina que los astrocitos de roedores jóvenes, lo cual sería una posible causa de perturbación de la función neuronal en el animal viejo [Rozovsky y col., 2005].

Por otra parte, en un estudio de nuestro laboratorio, se observó que los astrocitos del SR de ratas viejas tienen una arborescencia más pobre y de menor longitud que la de los animales jóvenes [Morel y col., 2015]. En el trabajo presentado aquí, observamos que la terapia con IGF-I icv provocó una disminución del recuento de astrocitos en el SR, así como un aumento en su arborescencia proximal, evidenciado por el análisis de Sholl. En principio, por lo expuesto arriba, estos resultados indicarían un efecto restaurativo del IGF-I sobre la astrogliosis y la pobre arborescencia de los astrocitos en animales viejos. Sin embargo, estas conclusiones deben tomarse con cautela, ya que la función de los astrocitos en el SNC está bajo intenso estudio (*para un excelente review sobre este tema, ver Perea y col., 2009*). No obstante esto, cabe destacar que nuestros resultados están en línea con otro trabajo, en donde se observó que el IGF-I ejerce una acción positiva sobre los astrocitos, protegiéndolos del estrés oxidativo [Genis y col., 2014].

En este trabajo observamos que el recuento de astrocitos GFAP + fue menor en las ratas IGF-I comparados con las ratas DsRed. En un principio esto fue un resultado interesante dado que se ha documentado que la gliosis aumenta con el envejecimiento [Geinisman y col., 1978]. Sin embargo, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se observó una clara

disminución del recuento GFAP en SR e Hilus en ratas viejas respecto a los animales jóvenes [Morel y col., 2015]. Además, estos resultados fueron validados en otro experimento independiente realizado en 2016 en nuestro laboratorio (**datos aún no publicados**).

Antaño Geinisman estudió el volumen de procesos de astrocitos de GD por microscopia electrónica en ratas Fischer-344 macho de 3 y 25 meses. En este trabajo, no encontró diferencias en el número de células pero sí en el volumen de los procesos (mayor en las ratas viejas), lo cual bautizó como 'hipertrofia astrogial' [Geinisman y cols., 1978].

En humanos, se cuantificaron los astrocitos de la corteza medio frontal de cadáveres de distintas edades sin demencia, agrupandolos en jóvenes y viejos por debajo y por encima de los 70 años. En este trabajo encontraron una correlación positiva entre el recuento y la edad de las personas [Hansen y col., 1987].

En otro trabajo se estudiaron astrocitos GFAP + en cerebelo de ratas Wistar macho de 3, 12 y 24 meses, y se observó que el volumen de la corteza cerebelar fue similar entre los grupos. Luego estudiaron los astrocitos GFAP + en la sustancia blanca y en la capa granular del cerebelo y encontraron que con el envejecimiento los astrocitos de la sustancia blanca disminuyeron mientras que aumentaron su tamaño y los astrocitos de la capa granular aumentaron en cantidad y en tamaño con la edad. Además, observaron cualitativamente un aumento en la inmunoreactividad en general [Sabbatini y col., 1999].

En el trabajo de Encinas y col. [Encinas y col., 2011], de referencia para nosotros, se declara de forma axiomática que los astrocitos del DG aumentan con el envejecimiento.

En otro estudio, en ratones C57BL/6JNNIA (B6) macho y hembra de 3,4; 12 y 24 meses, se realizó un recuento de astrocitos GFAP+ y de microglia Mac1+ en GD y CA1. Aquí encontraron que los astrocitos en CA1 y en el GD y la microglia en GD aumentaron con el envejecimiento en hembras pero no aumentaron en machos. Además, los machos tuvieron un recuento menor a las hembras [Mouton y col., 2002].

Por otra parte, otro grupo demostró un aumento del ARNm para GFAP en cerebro de ratas viejas Fischer-344 macho [Nichols y col., 1993]. En otro trabajo, se mostró una creciente inmunoreactividad para GFAP en el hipocampo de ratas viejas Fischer-344 macho de 24 meses [Morgan y col., 1999].

El estudio morfométrico de astrocitos del cerebro viejo, así como su modulación por factores tróficos como el IGF-I, demanda estudios más intensos para unificar todos los resultados expuestos, probablemente tecnologías futuras permitan esclarecer este aspecto tan interesante de las células astrogiales.

Capítulo 5. Estudios de terapia génica de largo plazo con IGF-I en el hipocampo de la rata senil y su implicancia en la modulación de genes relevantes para la memoria

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Journal of Gerontology*.

Pardo J, Abba MC, Lacunza E, Ogundele OM, Paiva I, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Jun 22.

5.1. Resumen

Existe vasta evidencia de que el IGF-I mejora la memoria espacial en la rata vieja. Además se ha demostrado que una constelación de cambios en la expresión génica está relacionada al fenotipo del hipocampo viejo. No obstante esto, no existen estudios que describan los efectos del IGF-I en el transcriptoma hipocampal de roedores viejos. En este trabajo, implementamos terapia génica con IGF-I de largo plazo con un adenovector HD para mejorar la memoria espacial de las ratas y analizamos los cambios en su transcriptoma hipocampal comparando con los efectos de un vector control. En el Barnes Maze (BM), las ratas experimentales mostraron una actividad exploratoria significativamente mayor en el agujero meta que el control. El secuenciamiento de ARN de hipocampo total mostró que 219 genes están diferencialmente expresados (DE) en las ratas de 28 meses tratadas con el adenovirus IGF-I, respecto al control. De entre los genes desregulados, 81 estuvieron subexpresados y 138 sobreexpresados. De los genes DE, identificamos una lista de genes relacionados a la expresión del IGF-I en el hipocampo, plasticidad sináptica y función neuronal en general. Nuestro trabajo es el primer abordaje de terapia con IGF-I a largo plazo para tratar memoria espacial en ratas viejas y los resultados obtenidos proporcionan una primera aproximación acerca de los mecanismos moleculares que median las acciones neuroprotectoras del IGF-I en el hipocampo senil.

5.2. Objetivo específico

Realizar terapia génica a largo plazo con un adenovector IGF-I 'Helper Dependent' en el cerebro de la rata vieja (24 meses), estudiar su impacto en la memoria espacial y evaluar modulación de expresión génica en hipocampo por secuenciamiento de ARN.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Diseño experimental

Se utilizaron 23 ratas SD hembra de 28 meses de 267 ± 5 g de peso corporal.

El día -10, las ratas fueron divididas al azar en 2 grupos: **DsRed**, inyectadas con HDad-DsRed, N=10 e **IGF-I**, inyectadas con HDad-IGF-I, N=12. En el día experimental 0 las ratas fueron inyectadas icv con los vectores IGF-I o DsRed y, el día 80, se extrajo LCR de la cisterna magna (4.3.4). El mismo día se sacrificaron a algunos animales por decapitación rápida y se disectó su hipocampo derecho, del cual se extrajo ARN y fue sometido a secuenciación de ARN (3.3.6) y RT-QPCR para validación de algunos genes (3.3.7, **primers en tabla 4**). El resto de los animales se perfundieron para realizar IHQ (3.3.4). Para evaluar la memoria espacial se utilizó un protocolo de BM de largo plazo, similar al descrito en el 2.3.2, pero con 3 PTs. Los AT duraron 120 s y los PT 90 s. El día experimental -10 los animales fueron habituados a las cajas de salida y escape colocándolos en cada una de ellas por 180 s. El test fue organizado en 3 sesiones separadas por un mes, una previa a la inyección icv y las otras dos en los días experimentales 30-38 y 69-77 (**Fig. 24A**). Cada sesión fue de 9 días, con 4 ATs por día. El último día de cada sesión se realizó un PT para evaluar la preferencia por el agujero 0 como medida de la memoria espacial de los animales.

Tabla 4. Genes modulados por IGF-I validados por RT-qPCR

Gene	Primer Forward	Primer reverse	Tamaño de amplicón (bp)
Itga8	TGATTACCCAGATTTACTTGTCGG	AGCTGGGCATCCACTGTTAC	90
Sypl2	GACTGATGTCAAAGGGGCCA	AGCCAAAGAGCACAGAGATGT	134
Dusp1	TGATCAACGTCTCGGCCAAT	TCACGAACTCAAAGGCCTCG	258
Nnat	CTCTTGCTGTCCCTTGCCTAT	CTGCGTGAGACCAGGGATAAG	204

5.3.2 Adenovectores HD

Los HDAds fueron previamente contruidos en nuestro laboratorio [Schwerdt y col., 2017] utilizando un kit comercializado por Microbix Biosystems (Ontario, Canada). El kit provee el plásmido shuttle pC4HSU, el adenovirus helper H14 y células de la línea 293 Cre4. Para la construcción se siguieron las instrucciones del manual de Microbix y

aquellas descritas por Oka y Chan [Oka y Chan, 2001]. Brevemente, primero el cassette de expresión conteniendo los transgenes de interés, el ADNc para IGF-I de rata o DsRed, fueron clonados en el pC4HSU. Este plásmido consiste en los ITRs para el adenovirus Ad 5, la señal de empaquetamiento y parte del gen adenoviral E4 más un ADN no codificante de relleno de origen humano, el cual permite mantener un tamaño apropiado del ADN viral (28-31 Kbp) de modo que la eficiencia de empaquetamiento del ADN en las cápsides se mantenga pero que sea suficientemente diferente del ADN del RAd helper H14 como para que su banda se separe a suficiente distancia de este en los gradientes de CsCl, minimizando de este modo el riesgo de contaminación del HD-RAd generado con el H14. Luego, el vector *shuttle* conteniendo el casete de interés es transfectado en células 293 Cre4 que al mismo tiempo son infectadas con el RAd H14, cuya señal de empaquetamiento está flanqueada por sitios lox P, reconocidos por la Cre recombinasa expresada por las células 293 Cre4. Por tanto, el virus helper provee en trans todos los productos virales necesarios para la generación del HD-RAd deseado. Después de una serie de co-infecciones iterativas con el HD-RAd y el virus H14, se genera una concentración suficientemente alta de HD-RAd mientras que sólo se producen muy bajos niveles de RAd H14 debido al clivaje de la señal de empaquetamiento de H14 efectuada por la Cre recombinasa. Finalmente los virus se titulan con el método de la titulación de partículas virales físicas [Oka y Chan, 2001].

5.3.3 Inyecciones estereotáxicas

Las cirugías se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita en el *capítulo 5* excepto por el virus inyectado. Respecto a esto, los animales fueron inyectados de forma bilateral con 8 µl por lado de una suspensión que $1,7 \times 10^{12}$ partículas virales físicas del vector adecuado.

5.3.4. Análisis del secuenciamiento de ARN

La decodificación de los datos fue realizada como se describió en 3.3.8. Sin embargo, el análisis ulterior de genes DE fue realizado utilizando otras herramientas bioinformáticas:

Para identificar los genes DE entre las muestras de hipocampo de ratas IGF-I y DsRed, se utilizó el algoritmo edgeR [Robinson y cols., 2010]. Los análisis de enriquecimiento funcional se realizaron con las herramientas DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), Enrichr

(<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) y GeneMania (<http://genemania.org/>). La integración de los datos y la visualización fueron realizados con el programa R y el software MultiExperiment Viewer (MeV v4.9) [Saeed y cols., 2014].

5.3.5. Análisis estadístico

Los datos de comportamiento fueron analizados con el software GraphPad Prism v6. Las latencias y los errores fueron analizados con ANOVA de dos vías, considerando como factores a los AT y al tratamiento. Cuando el ANOVA fue significativo, las comparaciones entre las medias de los ATs y la media del AT1 fueron realizadas con el test post hoc de Sidak. Los resultados de los niveles de IGF-I en LCR, las exploraciones del agujero meta en los PT y los de RT-qPCR se analizaron con test-t de Student no pareado. Para el análisis del secuenciamiento de ARN utilizamos el software R y los paquetes de Bioconductor.

5.4. Resultados

5.4.1 Efectos de la terapia génica con IGF-I en la memoria espacial

Latencia y errores. Durante la primera sesión de entrenamiento (antes del tratamiento) ambos parámetros cayeron significativamente a tasas comparables en ambos grupos (ANOVA de 2 vías, factor tratamiento $p=0.19$, factor AT $p<0.0001$, interacción $p=0.34$) (test post-hoc Sidak AT2 en adelante vs AT1 $p<0.0001$). Durante las sesiones 2 y 3 ambos parámetros, latencias y errores, permanecieron bajos en ambos grupos, lo cual indica que los animales recordaron la localización del agujero meta del mismo modo que al final de la sesión 1 (**Fig. 24 B y C**). Por lo tanto, el tratamiento no indujo diferencias significativas en la latencia y los errores.

Exploración de agujeros. La exploración de los agujeros mostró una campana centrada en el agujero 0 en el PT pre-tratamiento (**Fig. 24D**). Treinta y ocho días después de la inyección del vector, también se observó una campana centrada en el agujero 0, que fue comparable en ambos grupos (**Fig. 24E**). En el último PT, 77 días post-tratamiento, la exploración del agujero 0 fue significativamente mayor para el grupo IGF-I que para el DsRed (test-t no pareado $t=2,644$, $gl=20$, $p=0.016$) (**Fig. 24F**).

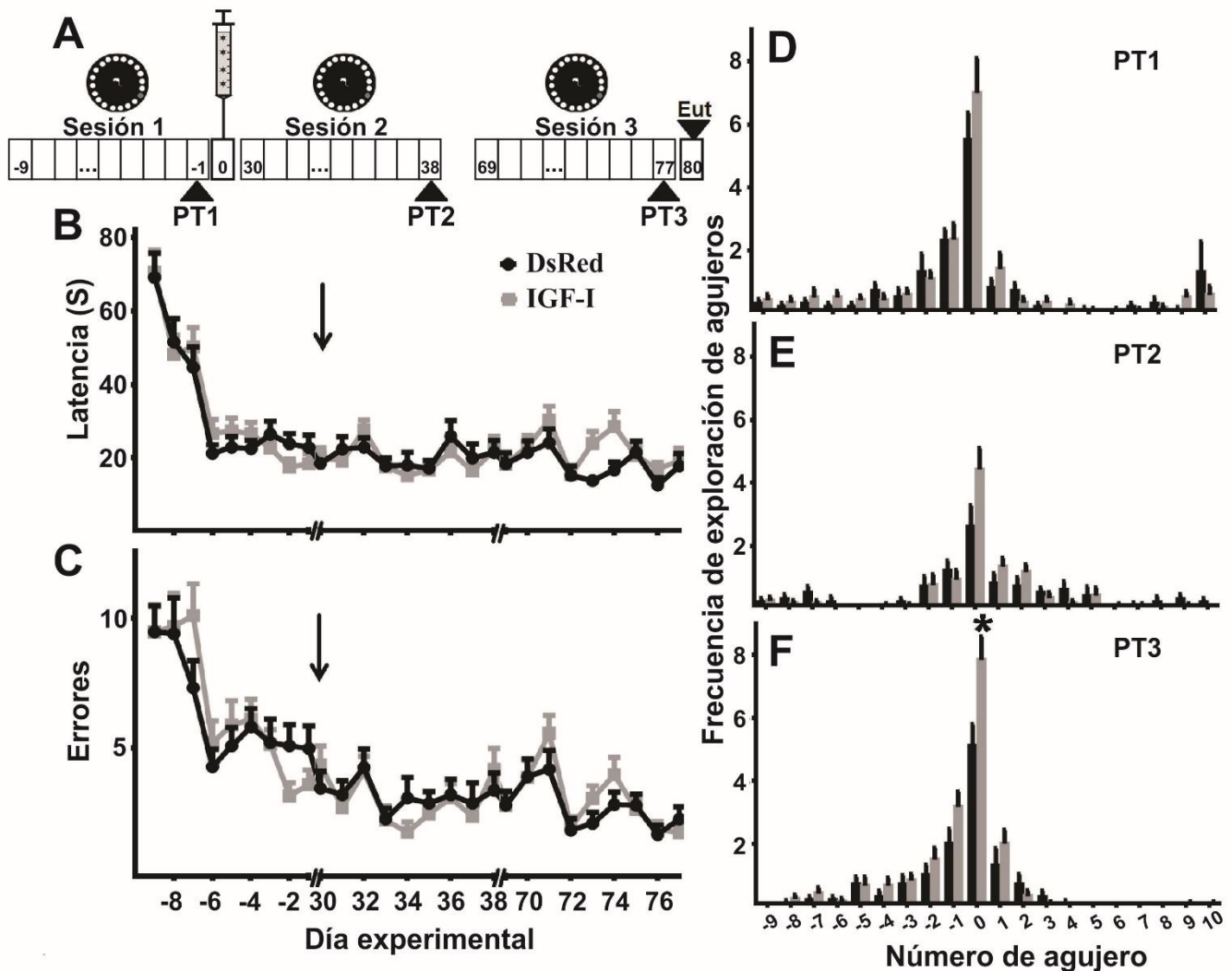


Figura 24. Efecto de la terapia génica de largo plazo con IGF-I sobre el desempeño de las ratas viejas en el BM.- El panel A muestra un diagrama del diseño experimental utilizado. Se emplearon 3 sesiones de 9 días cada una separadas por un mes. En cada día se realizaron 4 ATs. Al final de cada sesión se realizó un PT. Los adenovectores HD fueron inyectados el día 0 (ver ícono de la jeringa). Eut= Eutanasia. Los paneles B y C muestran las latencias y errores en el período de aprendizaje de las 3 sesiones evaluadas. La flecha indica el día de inyección del vector (día 0). Los paneles D, E y F muestran la exploración de agujeros en los PTs 1, 2 y 3, respectivamente. Nótese el incremento en el pico de exploración del agujero 0 en el grupo IGF-I para el PT3. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Las comparaciones entre los grupos DsRed e IGF-I fueron realizadas para cada tiempo. *: $P < 0.05$. $N = 10$ para el grupo DsRed y $N = 12$ grupo IGF-I.

5.4.2 Expresión de los transgenes IGF-I y DsRed

Debido a que estos virus son distintos a los empleados en el trabajo descrito en el capítulo 4, fue necesario caracterizar la expresión transgénica. Dos días después de la inyección del HDad-DsRed se procedió a la eutanasia de un animal y se observó una intensa expresión de DsRed en las células endimarias que recubren los ventrículos laterales (Fig. 25 A-D).

Ochenta días después de la inyección del vector (el día de la eutanasia) la expresión de la DsRed todavía fue observable en la capa de células endimarias (**Fig. 25 E-G**). El día experimental 80, los niveles de IGF-I en LCR fueron significativamente mayores en el grupo IGF-I respecto al DsRed (test-t no pareado $t=4.967$, $gl=5$, $p=0.0042$) (**Fig. 25H**).

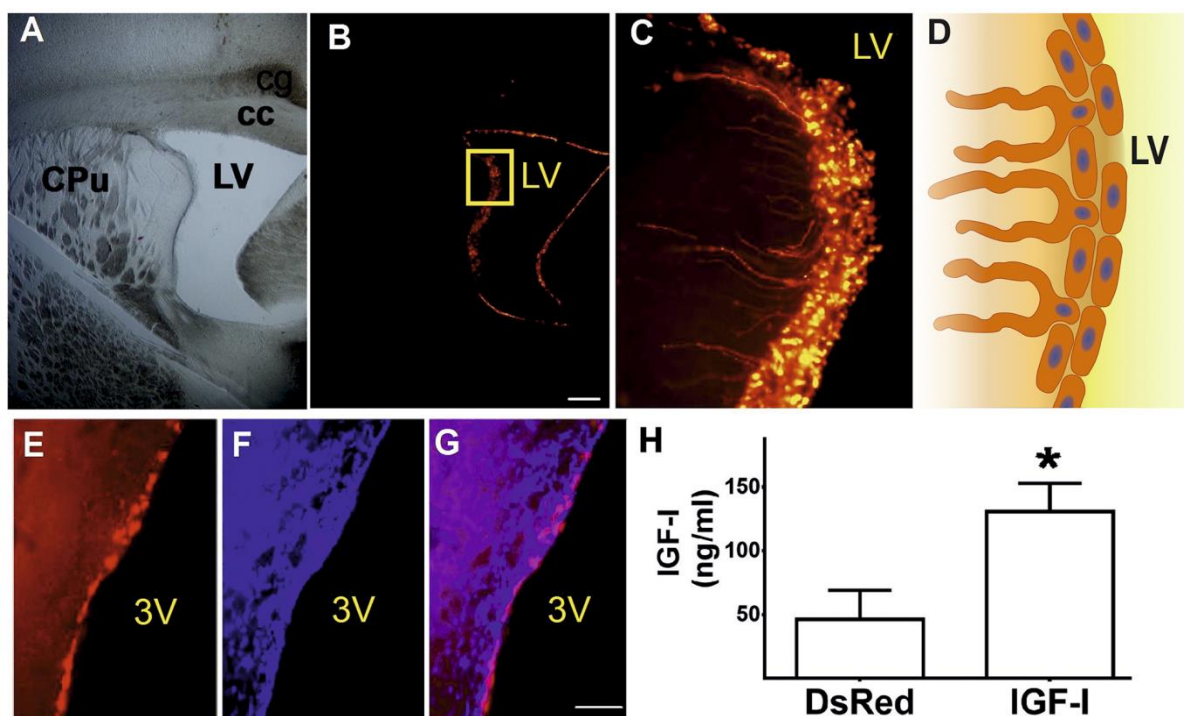








Figura 25. Expresión recombinante de DsRed e IGF-I. **A.** Se muestra una imagen en campo claro del ventrículo lateral (LV) de una rata vieja 2 días después de la inyección del HDad-DsRed. **B.** Se muestra la fluorescencia de DsRed en la capa endimaria del LV. **C.** Se muestra un aumento de la región encuadrada en el panel B. Nótese que el HDad-DsRed transduce células con y sin prolongaciones. **D.** Se muestra un esquema de la foto del panel C. Los paneles **E**, **F** y **G** muestran, en el tercer ventrículo (3V) al final del experimento (día 80), la fluorescencia del DsRed, la tinción con DAPI y la superposición de los 2 colores, respectivamente. **H.** Se muestran los niveles del IGF-I en el LCR, al día 80 post-inyección, en ambos grupos experimentales. N=3 para el grupo DsRed y N=4 para el grupo IGF-I. CPu, Caudado Putamen. Escala para A y B=250 μ m; escala para G,C,E y F=100 μ m.

5.4.3 Genes hipocampales cuya expresión se modifica con la terapia génica con IGF-I en ratas viejas

El análisis del transcriptoma hipocampal reveló que después de la terapia con IGF-I de largo plazo, 219 genes fueron significativamente desregulados ($P<0.05$), 81 subexpresados y 138 sobreexpresados. De la lista de genes, identificamos una sublista de genes relevantes

relacionados a la expresión del IGF-I y su transporte; a la plasticidad sináptica y neurogénesis; al clivaje de péptido β amiloide; y a la función neuronal en general (**Tabla 5**).

Tabla 5. Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre genes funcionalmente relevantes en el hipocampo de ratas viejas.

Gen	Función biológica	Expresión	Referencia
Igf1 	Neuroprotección	↑	<i>Pardo y col., 2016</i>
Dcx 	Neurogénesis	↑	<i>Gleeson y col., 1999</i>
Itga-8	Interacción célula-célula	↑ ↑ ↑	<i>Bossy y col., 1991; Chan y col., 2010</i>
Sypl2	Sinapsis	↑ ↑	<i>Shimuta y col., 1998</i>
Nnat		↑ ↑	<i>Dou y col., 1996; Kagitani y col., 1997</i>
Igfbp4 	Transporte de IGFs	↓	<i>Shimazaki y col., 1990</i>
Igfbp6 		↑	<i>Ehrenborg y col., 1999</i>
Ang2 	Crecimiento de vasos sanguíneos	↓ ↓	<i>Yuan y col., 2009</i>
Dusp1	Respuesta a glucocorticoides	↓ ↓	<i>Arango-Lievano y col., 2016</i>
Nr4a1		↓	
MiRNA 186 	Procesamiento de β -amiloide	↑	<i>Kim y col., 2016</i>

Nota: Las referencias se incluyeron en la Bibliografía de este escrito. El número de flechas para cada gen indica la magnitud de su desregulación en ratas IGF-I, respecto del control placebo DsRed.

Interesantemente, el análisis de los resultados por la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genoma (KEGG) reveló que el IGF-I está funcionalmente relacionado a varias vías metabólicas y a varios genes hipocampales desregulados por el tratamiento (**Fig. 26 A-C**). Para validar nuestro secuenciamiento, realizamos una RT-qPCR de 4 genes representativos: Itga 8, Sypl2, Dusp1 y Nnat. Los resultados fueron acordes (**Fig. 26D**).

Genes modulados por el IGF-I. Los genes de IGF-I y de su proteína transportadora IGFBP-6 en el hipocampo estuvieron significativamente sobreexpresados en ratas IGF-I después de la terapia. Por el contrario, después del tratamiento se subexpresó al gen para la proteína transportadora IGFBP-4. Además, se encontraron tres genes sobreexpresados luego

de la terapia con IGF-I relacionados a procesos sinápticos. Estos fueron los genes de las proteínas Neuronatina (Nnat), Subunidad $\alpha 8$ de Integrina (Itga-8) y la Proteína Sinaptofisina-Símil 2 (Sypl2).

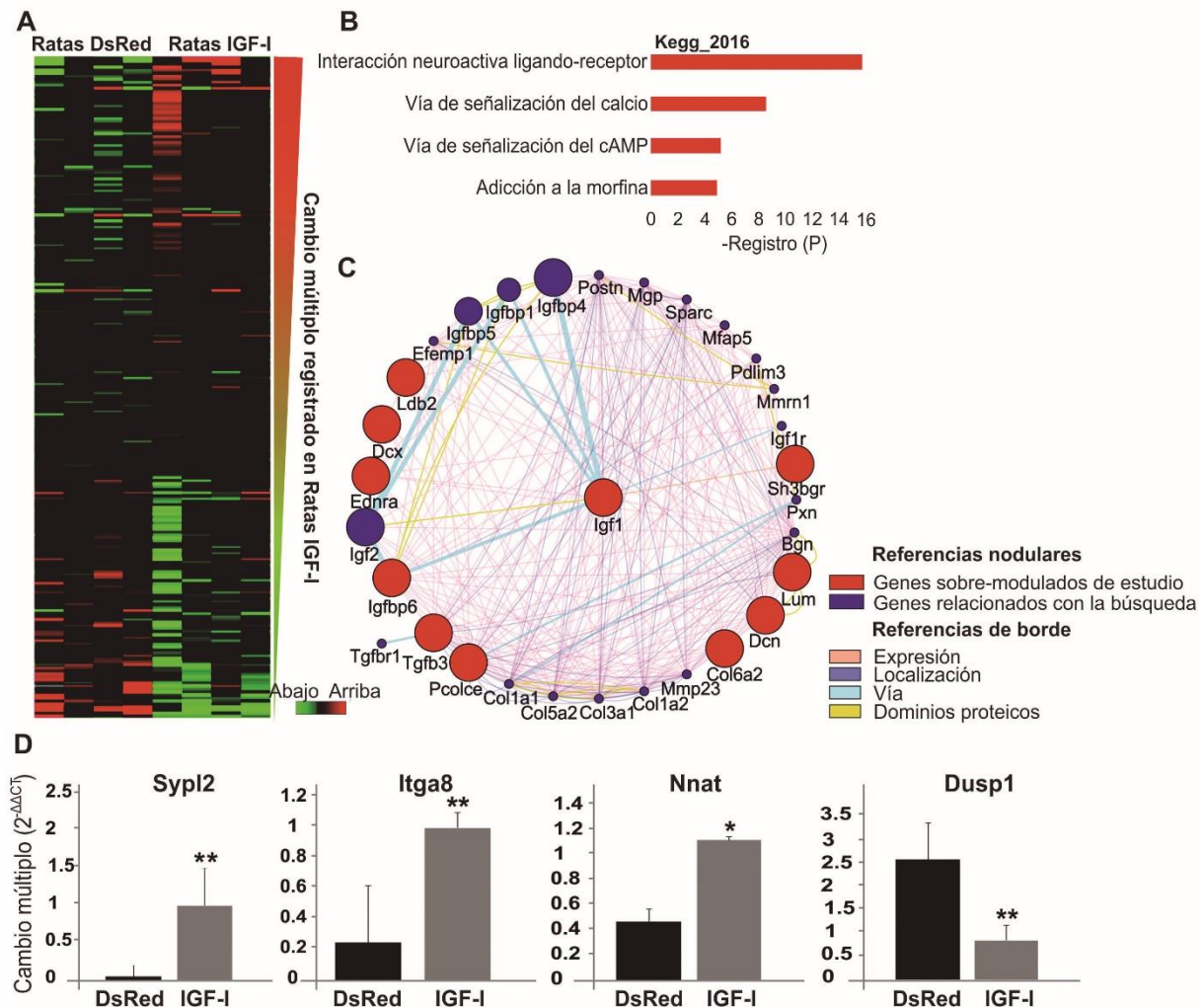


Figura 26. Red de genes modulados por el IGF-I. **A.** Mapa de calor de los 219 genes DE (138 sobreexpresados y 81 subexpresados) entre los grupos DsRed e IGF-I. **B.** Enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados en las ratas IGF-I, basado en la base de datos KEGG-2016. **C.** Representación en red de los genes sobreexpresados de nuestra lista que están relacionados al IGF-I. Los nodos rojos indican genes de nuestra lista, mientras que los nodos azules indican genes relacionados a los de nuestra lista. **D.** Gráficos de barra mostrando la RT-qPCR de cuatro genes representativos inducidos o reprimidos por la terapia génica con IGF-I. N=4 para ambos grupos. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Otro gen sobreexpresado fue el DCX, el gen que codifica la proteína Doble cortina, la cual se relaciona con la neurogénesis ya que las neuronas inmaduras de DG expresan ese marcador.

Además, la terapia con IGF-I produjo una sobreexpresión de miRNA-186 en el hipocampo. El miRNA-186 es un potente regulador negativo de la enzima que cliva al precursor β amiloide BACE1 en células neuronales [Kim y cols., 2016].

Por último, la terapia con IGF-I indujo la subexpresión de los genes *Dusp1* y *Nr4a1*, que codifican para la fosfatasa DUSP1 y para el factor de transcripción NR4A1. Ambas proteínas son inducidas cuando el receptor de glucocorticoides se fosforila y activa [Arango-Lievano y col., 2016].

5.4.4 Análisis de la microglia en el SR y el DH del hipocampo

En el SR no hubo diferencias significativas en el número total de células microgliales (ANOVA factor grupo $F=1,39$; $GL=1$; $p=0,27$). El grupo IGF-I presentó un número significativamente menor de microglia no reactiva (ANOVA factor grupo $F=11,56$; $GL=1$; $p=0,01$) (test LSD de comparación de medias, $p=0,01$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de microglia reactiva (ANOVA factor grupo $F=0,17$; $GL=1$; $p=0,69$ (Fig 27A).

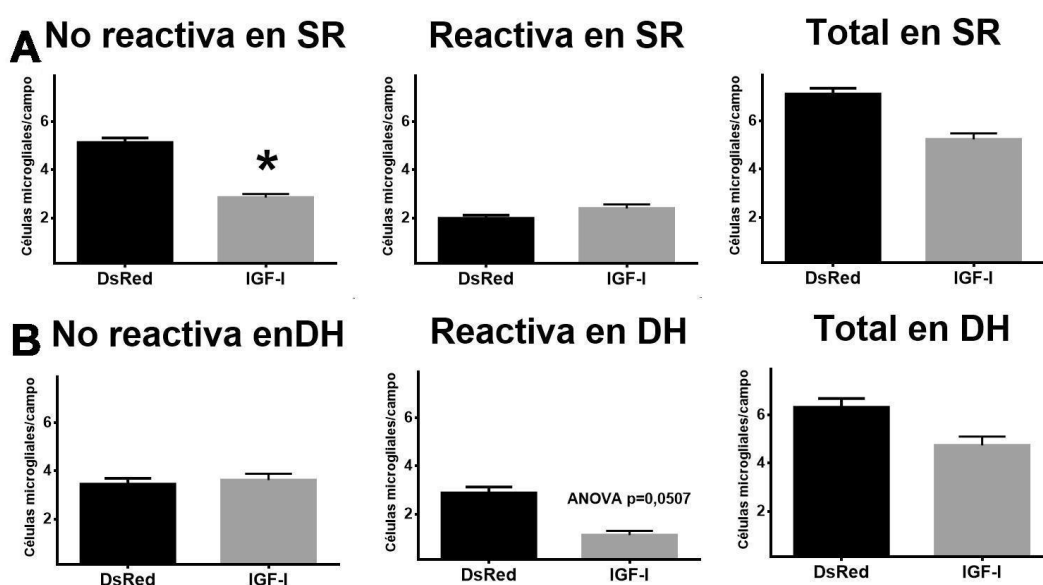


Figura 27. Modulación de la microglia por el IGF-I. A. Recuento de microglia en el SR de ambos grupos experimentales. B. Recuento de microglia en el DH de ambos grupos experimentales. * $p<0.05$. Se muestran las medias \pm error estándar. $N=4$ para DsRed v $N=6$ para grupo IGF-I

En el DH no hubo diferencias significativas en el número total de microglia (ANOVA factor grupo $F=1,08$; $GL=1$; $p=0,33$). No se encontraron diferencias significativas en el número de microglia no reactiva (ANOVA factor grupo $F=0,03$; $GL=1$; $p=0,86$). El análisis de la microglia reactiva mostró una clarísima tendencia a que el grupo IGF-I tuvo un recuento menor (ANOVA factor grupo $F=5,33$; $GL=1$; $p=0,05$) (**Fig 27B**).

5.4.5 Volumen del SR y el DH del hipocampo

Como era de esperarse en relación al *capítulo 4*, no se encontraron diferencias en el volumen del SR y del DH entre los grupos DsRed e IGF-I (test-t de Student no pareado $p=0,8$ y $p=0,28$ para SR y DH, respectivamente).

5.5. Discusión

El envejecimiento conlleva a una progresiva pérdida de la memoria. En un trabajo muy interesante se observó que al inducir experimentalmente potenciación de largo término (LTP) en las sinapsis hipocampales, esta persistió por menos tiempo en roedores viejos que en jóvenes, lo cual se correlacionó con un rápido olvido de información espacial [**Barnes y McNaughton, 1985**]. Asimismo, en varios tests de aprendizaje y memoria espacial se constató el claro deterioro en ratas viejas [**de Toledo-Morrell y col., 1984; Morris, 1984; Barnes, 1979**]. La neurogenesis hipocampal es crucial para ciertos tipos de memoria y cae significativamente con el envejecimiento [**Lichtenwalner y col., 2001; capítulo 3**].

Este estudio confirma nuestros resultados previos sobre la capacidad restauradora de la terapia génica con IGF-I en la memoria espacial (*capítulo 4*). Resulta interesante notar que la mejora en la memoria se observó en el PT3, el último día de evaluación. En el PT2 los grupos DsRed e IGF-I tuvieron un desempeño similar en el paradigma. Cabe destacar que, además de que se utilizó un vector distinto, el protocolo utilizado aquí fue más extenso y permitió un mejor aprendizaje que aquel descrito en el *capítulo 4*. Por lo tanto, hipotetizamos que la terapia génica a largo plazo con IGF-I descrita aquí fue eficiente para prevenir el deterioro de la memoria espacial en el largo plazo (día 77), mientras que en un menor plazo de 38 días (PT2), el efecto de la terapia no puede observarse dado que el protocolo de aprendizaje fue tan

eficiente que ambos grupos experimentales tuvieron un buen desempeño en el test, independientemente del IGF-I.

Hasta donde sabemos, no existen estudios documentados sobre el efecto de factores neuroprotectores en el transcriptoma hipocampal de ratas viejas. De los 219 genes significativamente desregulados por la terapia con IGF-I, identificamos una lista corta de genes con función conocida que discutimos a continuación.

Nuestro adenovector fue inyectado icv, por lo tanto, el gen del IGF-I sobreexpresado en el hipocampo es de origen endógeno, directa o indirectamente estimulado por el IGF-I recombinante proveniente del LCR. Posiblemente la sobreexpresión del IGF-I contribuyó a la desregulación de varios genes en las ratas experimentales (**Fig. 26**). Las proteínas transportadoras IGFBP4 e IGFBP6 son miembros de la familia de proteínas transportadoras de factores de crecimiento insulino-símiles (**1.5.3**). Estas proteínas se unen y prolongan la vida media de IGF-I e IGF-II en sangre y alteran su interacción con receptores en la superficie [Shimasaki y col., 1990; Ehrenborg y col., 1999].

La terapia génica indujo una subexpresión del gen de la IGFBP4 y una sobreexpresión de IGFBP6. Por lo tanto, los niveles hipocampales de IGF-I e IGF-II posiblemente hayan cambiado como resultado de la proporción alterada de las proteínas transportadoras.

Genes involucrados en la plasticidad sináptica y neurogénesis. Cuatro genes relacionados a procesos sinápticos y neurogénesis fueron sobreexpresados después de la terapia: Sypl2, Nnat, Itga-8 y DCX. Sypl2 es un componente integral de la membrana de la vesícula sináptica, participa en la homeostasis del calcio y en el desarrollo de la substantia nigra [Shimuta y col., 1998]. Sypl2 se induce en astrocitos humanos que circundan placas seniles conteniendo péptido A β . En cerebros de pacientes con AD, la expresión incrementada de Sypl2 se observó solamente en los astrocitos activados. Por otra parte, en astrocitos quiescentes de cerebros de individuos sanos y en regiones del cerebro libres de lesión de pacientes de AD, la expresión de este gen es baja [Satoh y col., 2012]. Nosotros hipotetizamos que la sobreexpresión de Sypl2 puede tener un rol neuroprotector.

Nnat es un gen que codifica una proteína del retículo endoplásmico [Dou y col., 1996; Kagitani y col., 1997]. Sus niveles de ARNm alcanzan un pico en el desarrollo temprano del cerebro, para luego descender en el periodo postnatal [Poon y col., 2006]. No obstante esto, trazas de ARNm de neuronatina continúan presentes incluso en el cerebro adulto en regiones tales como el hipotálamo, hipocampo e hipófisis [Joseph y col., 1995; Usui y col., 1997; Oyang y col., 2011]. Los niveles de NNAT aumentan durante la neurogenesis (días E16–19) [Joseph y col., 1995]. Oyang y col. demostraron que NNAT regula los niveles de calcio en

las dendritas antagonizando la actividad de la bomba SERCA [Oyang y col., 2011]. A pesar de lo mencionado arriba sobre la función de NNAT durante el desarrollo, su rol en neuronas maduras no ha sido examinado hasta el momento. Aquí, demostramos que el IGF-I indujo una sobreexpresión de Nnat en el hipocampo viejo, lo cual sugiere que Nnat podría ejercer un rol modulador en la plasticidad neuronal durante el envejecimiento.

La expresión de la integrina A8 (ITGA8) en el cerebro media las interacciones célula-célula y regula el crecimiento de neuritas de neuronas motoras y sensoriales [Bossy y col., 1991; Chan y col., 2010]. Interesantemente, los ratones deficientes de ITGA8 en el cerebro anterior tienen deficiencias para lograr LTP hipocampal [Chan y cols., 2010]. En este contexto, la sobreexpresión de ITGA8 mostrada aquí en el hipocampo de ratas viejas podría contribuir a la restauración del LTP y, consecuentemente mejorar la memoria espacial.

La proteína DCX se une a los microtúbulos del citoesqueleto en neuronas inmaduras [Gleeson y col., 1999]. Como tal, la expresión de DCX en el DG del hipocampo indica directamente tasa de neurogénesis. En este trabajo observamos un aumento de la expresión del gen de DCX que se correlaciona con el mayor número de neuronas DCXir en el DG. Además, este estudio a largo plazo concuerda con lo que observamos con la terapia génica con IGF-I de corto plazo (*capítulo 4*). Ambos resultados refuerzan lo descrito previamente sobre la actividad neurogénica del IGF-I [Markowska y col., 1998].

Por otra parte, los estudios sobre el rol de los miRNAs en el envejecimiento cerebral y la patogénesis de AD están apenas en sus primeros estadios [Somel y col., 2010; Eda y col., 2011; Persengiev y col., 2011; Inukai y col., 2011]. Los miRNAs son pequeñas moléculas de ARN que controlan la expresión génica post-transcripcionalmente, típicamente a través de la unión a secuencias diana complementarias en las regiones UTR 3' de los ARNm. Se ha estudiado que con el envejecimiento, la expresión de miRNAs disminuye en los cerebros de peces [Baumgart y col., 2012], ratones [Inukai y col., 2011; Cheng y col., 2013; Li y col., 2011], ratas [Rao y col., 2013], chimpancés [Persengiev y col., 2011], macacos e incluso humanos [Somel y col., 2010; Persengiev y col., 2011]. Además, los niveles bajos de miRNA podrían contribuir a la pérdida funcional del cerebro en general y a la neurodegeneración [Abe y col., 2013; Lau y col., 2013; Persengiev y col., 2012].

En este contexto, nuestro descubrimiento de que la terapia génica induce la expresión de miR-186 en el hipocampo de ratas de 28 meses parece ser relevante en cuanto a su mejora en la memoria espacial. En un trabajo reciente [Kim y col., 2016] se observó que la expresión de miR-186 disminuye en la corteza cerebral de ratones de 13 meses, en comparación con aquellos de 2 meses, una tendencia que se intensifica hacia los 24 meses. miRNA-186 es un

potente regulador negativo de BACE1 en neuronas y, como tal, podría ser uno de links moleculares entre el envejecimiento del cerebro y el alto riesgo de padecer AD con el envejecimiento. Además, la sobreexpresión de miRNA-186 disminuye los niveles de péptido A β en células que expresan una proteína precursora amiloide humana mutante **[Kim y col., 2016]**. En este contexto, nuestro descubrimiento sobre la inducción del miRNA-186 en el hipocampo de ratas tratadas sugiere que este tiene un rol neuroprotector.

Por último, el recuento de la microglía mostró una tendencia para el grupo IGF-I de tener un recuento menor de infiltrado de células microgliales en la región del DH. Este resultado daría cuenta, en principio, de un acción antiinflamatoria del IGF-I sobre el hipocampo.

Capítulo 6. Construcción de vectores virales bicistrónicos para IGF1 y genes marcadores

6.1. Resumen

En nuestros experimentos de terapia génica con IGF-I icv [Pardo y col., 2016, Pardo y col., 2017] utilizamos adenovectores recombinantes portadores del gen para el IGF-I de rata. En estos experimentos fue necesario validar la expresión del IGF-I recombinante, por lo que realizamos RIA sobre muestras de LCR. Surgió entonces el interés por construir un sistema en el cual sea prescindible la validación por RIA de la expresión transgénica en nuestros experimentos de terapia génica. Por lo tanto, nos planteamos la construcción de sistemas bicistrónicos que expresen IGF-I y un gen marcador fluorescente en forma estequiométrica. Una vez caracterizado este sistema, la observación de fluorescencia en células transducidas sería suficiente para demostrar que las mismas expresan el transgén de IGF-I.

En un trabajo de nuestro laboratorio, se utilizó un sistema bicistrónico IGF-I-ires-DsRed por medio de un virus adeno-asociado (AAV) [Rodríguez y col., 2013]. Este fue construido por un core de vectores virales en Estados Unidos. Debido a que no poseemos la tecnología para la construcción de AAVs, nos propusimos generar vectores lentivirales (LV) que expresen IGF-I con GFP o DsRed, así como sistemas bicistrónicos que expresen DsRed con adenovirus de 1era generación (RAds) y *Helper-Dependent* (HD). Este capítulo muestra el progreso hacia la construcción de sistemas adenovirales bicistrónicos realizado hasta el momento. Se espera continuar con estas tareas en nuestro laboratorio en el futuro mediano. Los materiales y métodos de este capítulo se encuentran en el **Apéndice A**.

6.2. Objetivo específico

Construir vectores virales bicistrónicos para IGF-I y proteínas fluorescentes.

6.3. Construcción de vectores lentivirales

Los LVs se ensamblan en células HEK293T a partir de la cotransfección del plásmido shuttle (portador del transgen de interés) y los plásmidos de empaquetamiento (VSV, RRE y REV). Para construir el LV IGF-I-T2A-GFP, dispusimos del plásmido shuttle **CD526A**, el

cual contiene al promotor fuerte del factor de elongación eucariota P-EF1 seguido por sitios de reconocimiento de las endonucleasas XbaI y EcoRI, la secuencia autoproteolítica T2A y la GFP (**Fig 28A**).

Para la obtención del gen del IGF-I, dispusimos del plásmido **pAAV-IGF-I-ires-DsRed**, el cual contiene al promotor del Citomegalovirus (PCMV), la secuencia de ADNc para el IGF-Ib (IGF-I de rata isoforma b), secuencia de reconocimiento interno de ribosoma (ires), DsRed (proteína fluorescente roja) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGHPolyA) (**Fig 28B**). Se amplificó el gen del IGF-I por PCR utilizando los primers 'XbaI-for- IGF-I' y 'EcoRI rev IGF-I wo stop', los cuales poseen en sus extremos 5' los sitios de reconocimiento para las endonucleasas XbaI y EcoRI, respectivamente (**28C**)

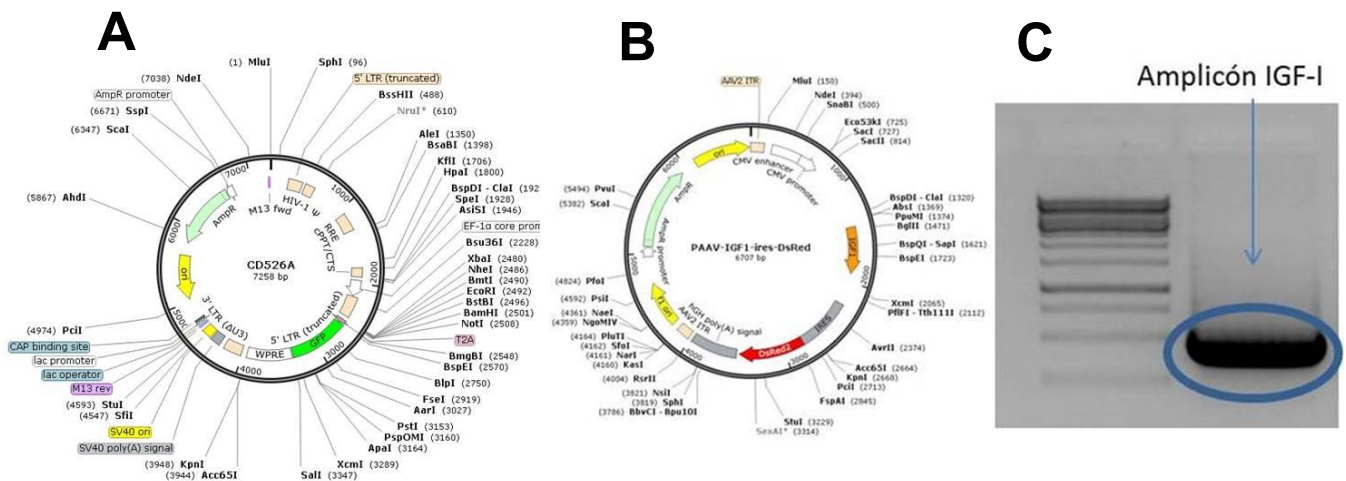


Figura 28. Clonado del IGF-I en CD526A. **A.** Plásmido shuttle CD526A. El gen del IGF-I fue subclonado en los sitios XbaI y EcoRI. **B.** Plásmido pAAV-IGF-I-ires-DsRed. El gen del IGF-I fue amplificado a partir de este plásmido desde su codón inicial ATG hasta su último codón sin incluir al stop. **C.** Gel de agarosa 1,5% en donde se observa al amplicón generado por PCR. Ladder: GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

El amplicón se subclonó en el **CD526A** y se obtuvo el **CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP**, el cual se chequeó por doble digestión con XbaI y EcoRI (**Fig. 29**).

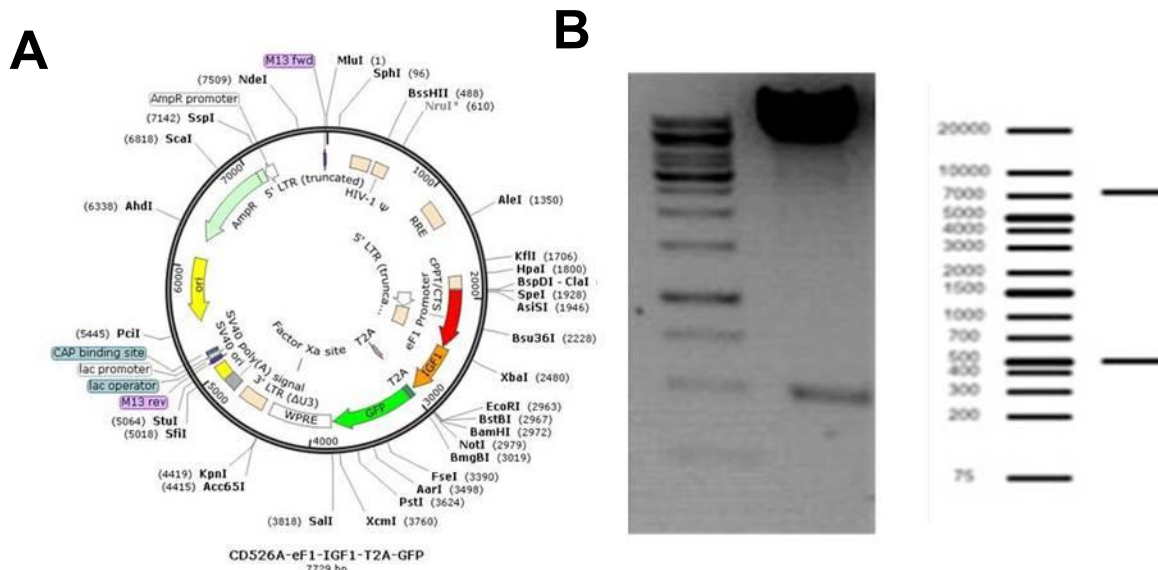


Figura 29. Plásmido CD526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP. A. Plásmido CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP. B. Gel de agarosa 1,5% en donde se observa el mapa de restricción obtenido y predicho a partir de la doble digestión con XbaI y EcoRI. Ladder : GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

Para validar la expresión de IGF-I por este plásmido, se transfectaron células HEK293 utilizando como control al plásmido CD-526A. Dos días post-transfección se validó la expresión de IGF-I por RT-qPCR y la presencia de la proteína recombinante por inmunocitoquímica (ICC) (**Fig. 30**).

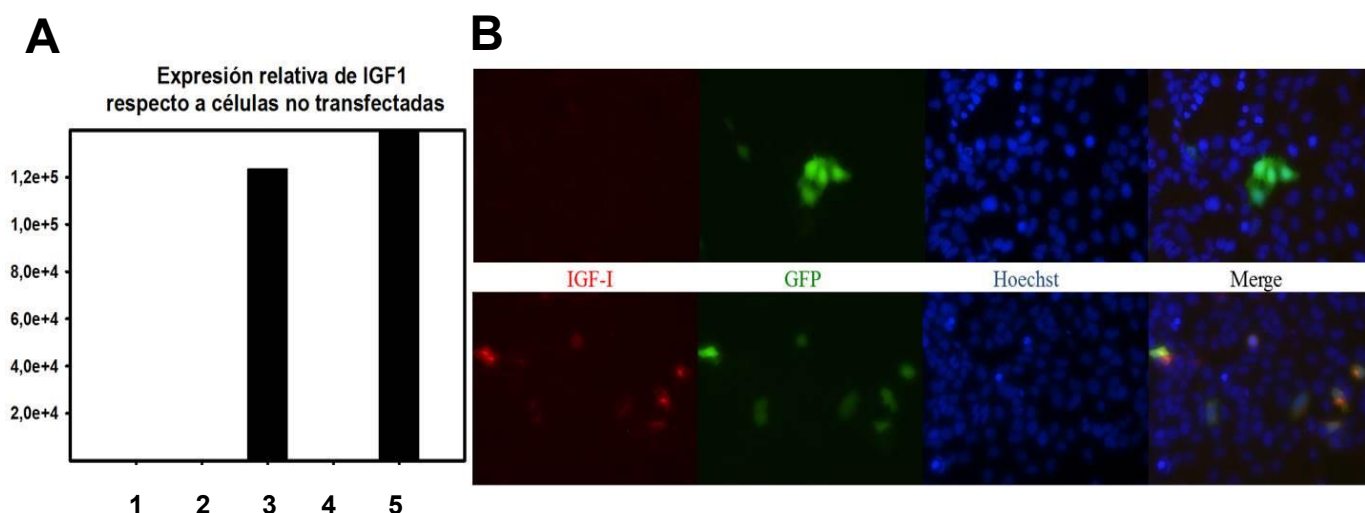


Figura 30. Validación del CD526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP. A. Niveles de ARNm para IGF-I medidos por qRT-PCR. 1. Células sin transfectar (control negativo de IGF-I endógeno) 2. pAAV-ires-DsRed (control negativo de IGF-I exógeno) 3. pAAV-IGF-I-ires-DsRed (control positivo de IGF-I exógeno) 4. CD-526A 5. CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP. B. ICC contra IGF-I para CD-526A (**panel superior**) y para CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP (**panel inferior**)

Luego, procedimos a contruir los LVs control y bicistrónico para IGF-I-GFP utilizando los plásmidos CD-526A y CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP, respectivamente. Evaluamos la funcionalidad de estos LVs *in vitro* por transducción de células A549 e *in vivo* por inyección estereotáxica en el hipocampo de rata (**Fig. 31**). En ambos casos se observó la fluorescencia verde. Si bien comprobamos que estos LVs funcionan, resta realizar la titulación de las alícuotas de virus para, en experimentos futuros, inyectar la misma cantidad de partículas lentivirales **control GFP** o **IGF-I-GFP**.

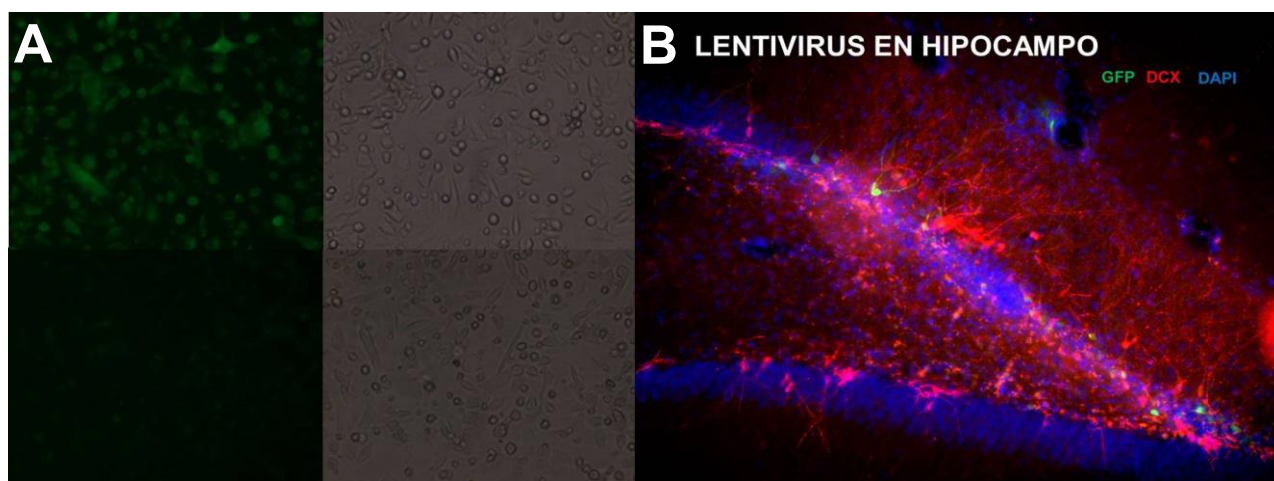


Figura 31. Funcionalidad del LV-IGF-I-GFP. **A.** Microfotografías en canal GFP (izquierda) y contraste de fase (derecha) de células A549 transducidas por 3 μ l de LV-GFP (**panel superior**) y LV-IGF-I-GFP (**panel inferior**). Nótese que si bien ambos LVs expresan GFP, la menor intensidad de fluorescencia del **panel inferior** se debe a un menor título del **LV-IGF-I-GFP**. **B.** Fotografía demostrando la expresión del LV-IGF-I-GFP en el DG del hipocampo de rata. Los núcleos celulares fueron teñidos de azul con DAPI y las neuronas jóvenes de rojo por IHQ contra DCX. Aumento para todas las fotografías: 20X.

Seguidamente, comenzamos la construcción de un LV bicistrónico para IGF-I-ires-DsRed y su LV control ires-DsRed. Para esto, dispusimos del plásmido shuttle FuGW (**Fig 32A**), el cual contiene al promotor fuerte de la ubiquitina seguido de la GFP. Para el subclonado, se amplificaron por PCR los fragmentos sin promotor ires-DsRed y IGF-I-ires-DsRed de los plásmidos pAAV-ires-DsRed (**Fig. 32B**) y pAAV-IGF-I-ires-DsRed (**Fig. 28B**), respectivamente. Para esto se utilizaron los primers `AgeI- IGF-I for`, `AgeI-ires-for` y `MunI- ds RED rev`. Dichos primers contenían en sus extremos 5' a los sitios de reconocimiento para las endonucleasas AgeI y MunI. El subclonado se realizó ligando a los amplicones digeridos con AgeI y MunI con el fragmento de 9192 bps del plásmido FuGW obtenido por digestión con AgeI y EcoRI (extremos compatibles con MunI) (**Fig. 32C**).

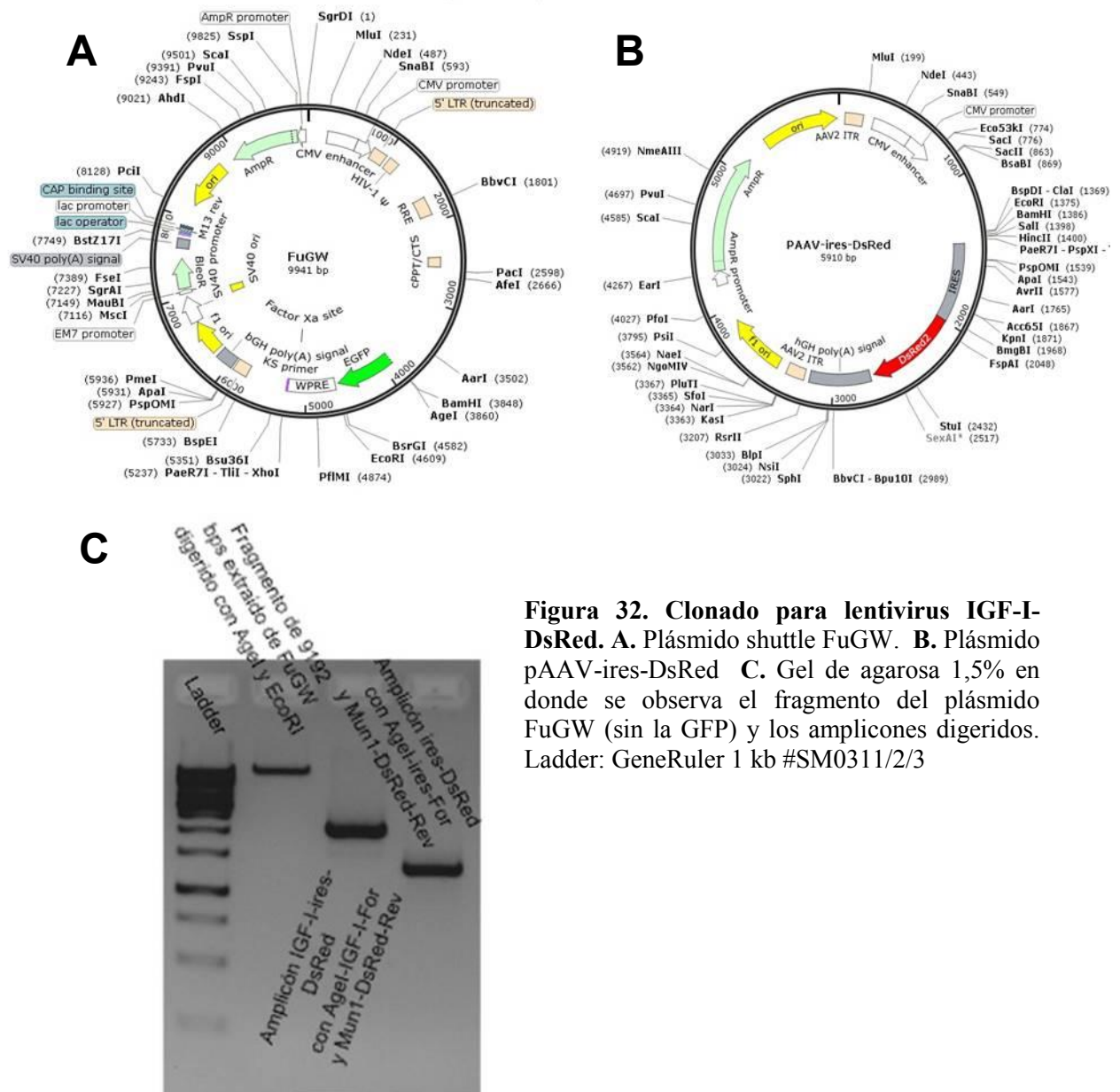


Figura 32. Clonado para lentivirus IGF-I-DsRed. A. Plásmido shuttle FuGW. **B.** Plásmido pAAV-ires-DsRed **C.** Gel de agarosa 1,5% en donde se observa el fragmento del plásmido FuGW (sin la GFP) y los amplicones digeridos. Ladder: GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

Los productos obtenidos FuGW-ires-DsRed y FuGW-IGF-I-ires-DsRed (**Fig. 33A,B**) fueron chequeados por mapa de restricción con las enzimas AgeI y XhoI (**Fig. 33 C,D**).

Para validar la expresión de IGF-I, se transfectaron células HEK293. Dos días post-transfección se validó la expresión de IGF-I por RT-qPCR y la presencia de la proteína recombinante por ICC (**Fig. 34 A,B**). Como prueba adicional de expresión de la proteína recombinante, se realizó un Western Blot con el lisado celular de ambos plásmidos FuGW y CD526 (**Fig. 34C**).

La generación de los lentivirus LV-IGF-I-ires-DsRed y su control LV- ires-DsRed queda pendiente.

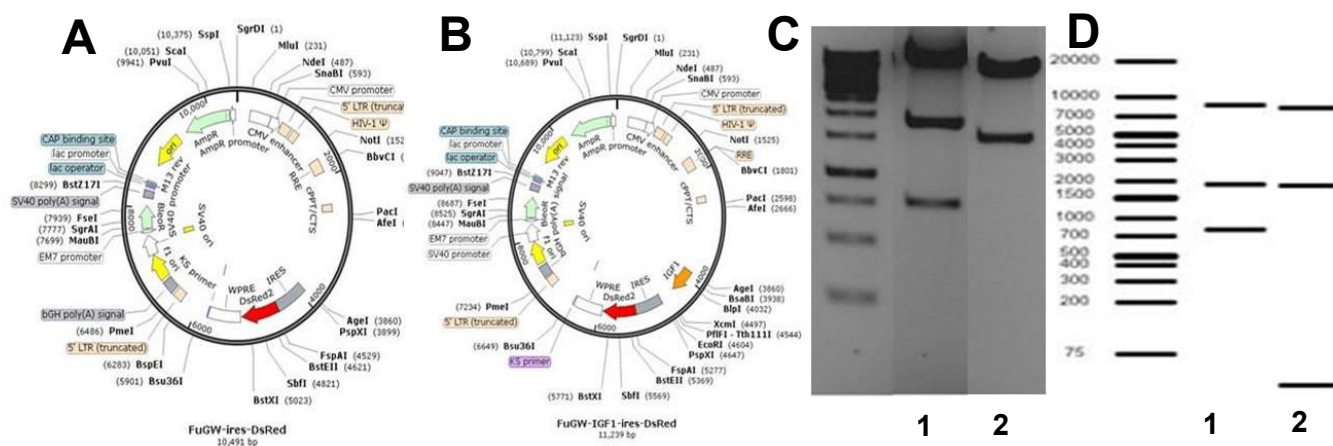


Figura 33. Chequeo de plásmidos FuGW-DsRed y FuGW-IGF-I-DsRed. A. Plásmido FuGW-ires-DsRed. **B.** Plásmido FuGW-IGF-I-ires-DsRed. **C.** Gel de agarosa 1,5% de los plásmidos digeridos con AgeI y XhoI. **D.** Mapa de restricción predicho. **1.** FuGW-IGF-I-ires-DsRed; **2.** FuGW-ires-DsRed

6.4. Construcción de vectores adenovirales

6.4.1. Vectores adenovirales de primera generación (RAds)

Los RAds se generan en células HEK293 a partir de la cotransfección del plásmido shuttle (portador del transgen de interés) y el plásmido genómico pBHGfrt (del)E1,3FLP. Nos propusimos construir los adenovirus RAD-IGF-I-ires-DsRed y su control RAD-ires-DsRed. Para esto, dispusimos del plásmido shuttle pDC511 (**Fig. 35A**). Se realizó una PCR sobre los plásmidos pAAV-pCMV-ires-DsRed-hGH-PolyA y pAAV-pCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGH-PolyA utilizando los primers 'Nhe1-for' y 'Nhe1 REV', los cuales poseen sitios de restricción para la endonucleasa NheI en su extremo 5' (**Fig. 35 B y C**). En esta PCR se amplificó el casete entero desde el promotor hasta la señal polyA.

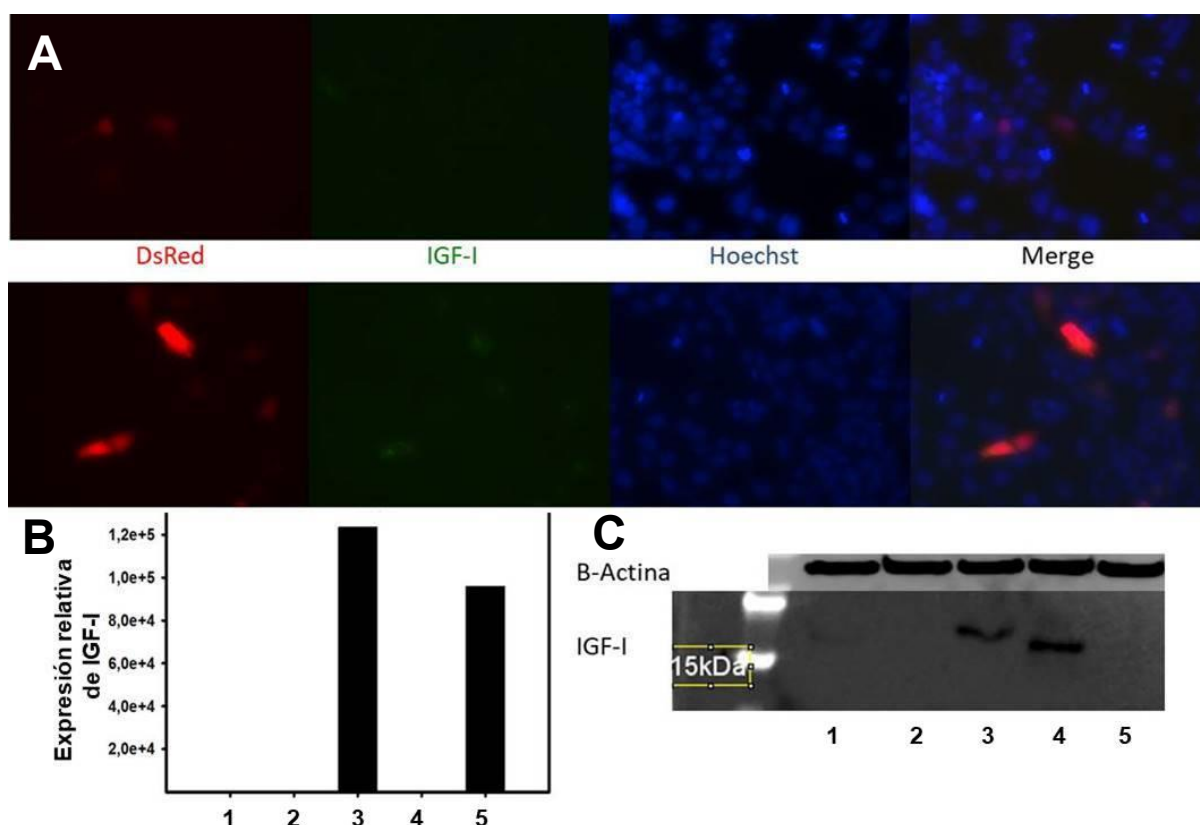


Figura 34. Validación de FuGW-DsRed y FuGW-IGF-I-DsRed. **A.** ICC contra IGF-I para FuGW-ires-DsRed (**panel superior**) y FuGW-IGF-I-ires-DsRed (**panel inferior**). **B.** Niveles de ARNm para IGF-I medidos por RT-qPCR. **1.** Células sin transfectar (control negativo de IGF-I endógeno) **2.** pAAV-ires-DsRed (control negativo de IGF-I exógeno) **3.** pAAV-IGF-I-ires-DsRed (control positivo de IGF-I exógeno) **4.** FuGW-ires-DsRed **5.** FuGW-IGF-I-ires-DsRed. **C.** Western Blot contra IGF-I y B-Actina de lisado de células transfectadas con: **1.** FuGW-IGF-I-ires-DsRed **2.** FuGW-ires-DsRed **3.** CD-526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP **4.** pAAV-IGF-I-ires-DsRed (control positivo de IGF-I exógeno) **5.** pAAV-ires-DsRed (control negativo de IGF-I exógeno). *Nótese la banda tenue en la calle 1 del WB y la banda con PM mayor en calle 3 (shift debido a la secuencia T2A)*

El pDC511 fue digerido con la enzima NheI y defosforilado en sus extremos 5' con la fosfatasa alcalina (CIP). Luego, los amplicones digeridos con las mismas enzimas fueron ligados al fragmento vector y se obtuvieron los plásmidos pDC511- IGF-I-ires-DsRed y pDC511- ires-DsRed (**Fig. 36**).

Para validar la expresión de IGF-I, se transfectaron células HEK293. Dos días post-transfección se validó la expresión de IGF-I por RT-qPCR y la presencia de la proteína recombinante por ICC (**Fig. 37 A y B**).

La generación de los RAds a partir de estos plásmidos está aún no se ha completado.

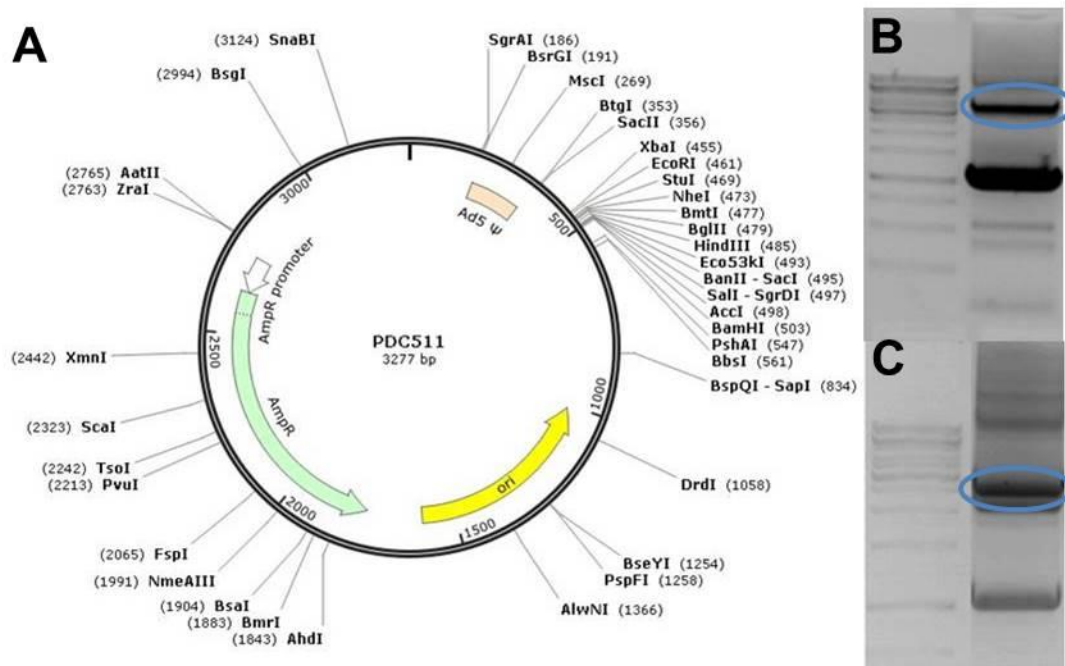


Figura 35. Clonado para RAD IGF-DsRed. A. Plásmido pDC511, el vector shuttle utilizado para generar RADs. B. Amplicón pCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGH-PolyA (4037 bps). C. Amplicón pCMV-ires-DsRed-hGH-PolyA (3191 bps). Ladder : GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

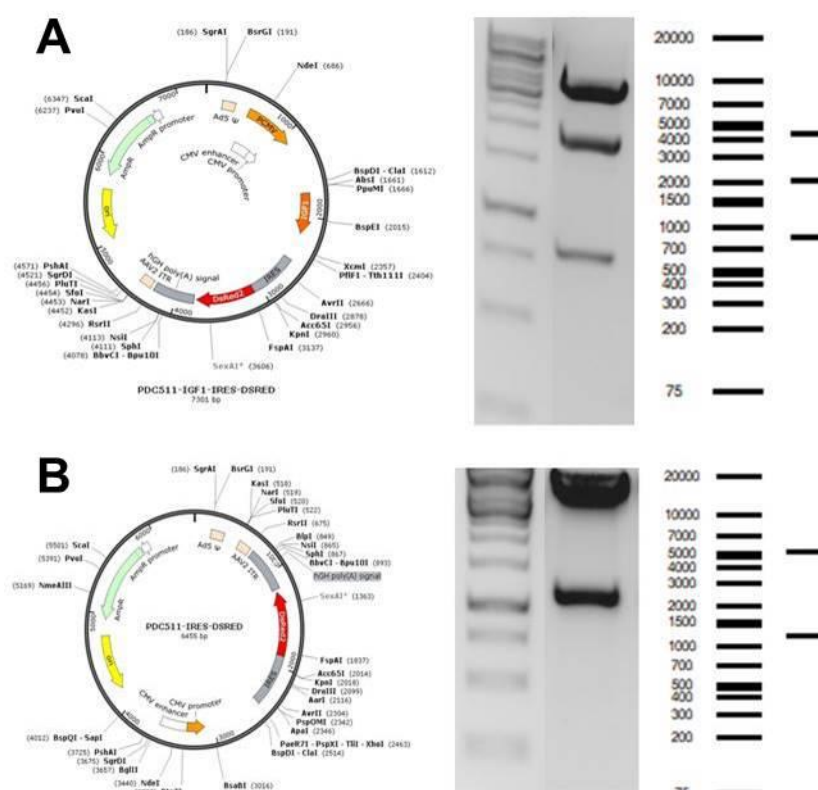


Figura 36. Chequeo de plásmidos para RADs obtenidos. A. Plásmido pDC511-IGF-I-ires-DsRed: esquema, patrón de digestión con la enzima BamHI obtenido en gel de agarosa 1,5% y predicho. B. Plásmido pDC511-ires-DsRed: esquema, patrón de digestión con la enzima BamHI obtenido en gel de agarosa 1,5% y predicho. Ladder: GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

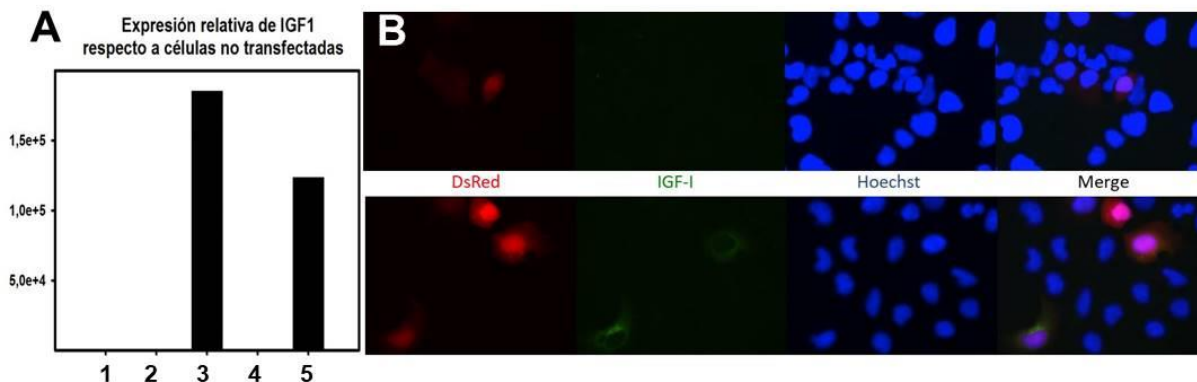


Figura 37. Validación de pDC511-DsRed y pDC511-IGF-I-DsRed. **A.** Niveles de ARNm para IGF-I medidos por RT-qPCR. **1.** Células sin transfectar (control negativo de IGF-I endógeno) **2.** pAAV-ires-DsRed (control negativo de IGF-I exógeno) **3.** pAAV-IGF-I-ires-DsRed (control positivo de IGF-I exógeno) **4.** pDC511- ires-DsRed **5.** pDC511- IGF-I-ires-DsRed. **B.** ICC contra IGF-I para y pDC511-ires-DsRed (**panel superior**) y pDC511-IGF-I-ires-DsRed (**panel inferior**)

6.4.2. Vectores adenovirales *Helper dependent*

Los vectores adenovirales *Helper Dependent* (HDAd) se generan a partir de la transfección del plásmido shuttle portador del transgén de interés y la infección del virus Helper H14 en células HEK293Cre [Oka & Chan, 2001]. Nos propusimos comenzar la construcción de HDAds bicistrónicos HDAd-IGF-I-ires-DsRed y su control HDAd-ires-DsRed. Para esto, dispusimos del plásmido shuttle pC4HSU (Fig. 38A) y nos fijamos como objetivo subclonar en este los casetes pCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGH-PolyA y pCMV-ires-DsRed-hGH-PolyA. De momento sólo hemos construido el plásmido pC4HSU-IGF-I-ires-DsRed, quedando pendiente la generación de su plásmido control pC4HSU-ires-DsRed así como la generación de ambos adenovectores. Para la generación del pC4HSU-IGF-I-ires-DsRed se amplificó el fragmento pCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGH-PolyA desde el plásmido pAAV-pCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGH-PolyA con los primers 'ASCI- for' (sitio de reconocimiento para la endonucleasa AscI en su extremo 5') y 'NHE1 REV' (Fig. 38B). Para lograr subclonarlo en el vector, este amplicón fue digerido con SfoI, sus extremos protruyentes fueron convertidos en romos con la enzima Pfu y luego fue digerido con AscI, quedándole un extremo romo y otro compatible para AscI. El plásmido vector fue digerido con AscI y SbfI (extremo romo) y ligado al amplicón mencionado anteriormente. Como resultado se obtuvo el pC4HSU-IGF-I-ires-DsRed, el cual fue chequeado por digestión con PmeI (Fig 38C), y su expresión de IGF-I y DsRed fue corroborada por transfección en células HEK293 (Fig. 38D y E)

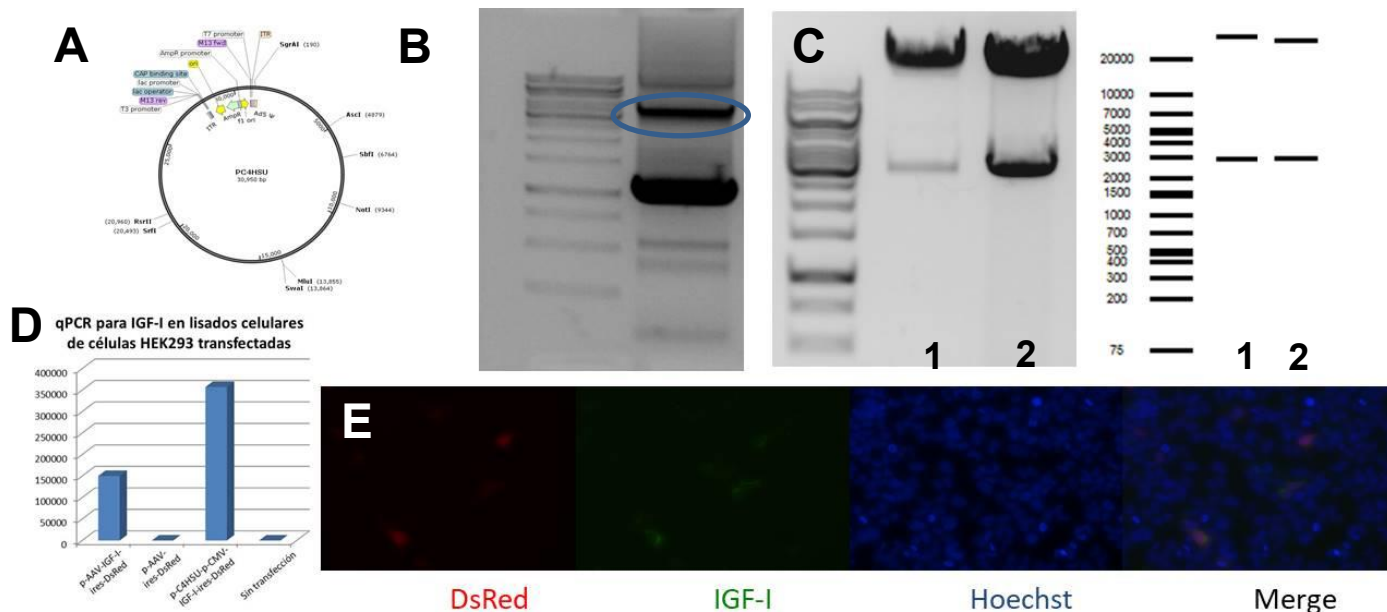


Figura 38. Construcción y validación del pC4HSU-IGF-I- DsRed. **A.** Plásmido shuttle pC4HSU. **B.** Amplicón PCMV-IGF-I-ires-DsRed-hGHPolyA. **C.** Patrón de digestión con la enzima PmeI en gel de agarosa 1,5% y predicho de pC4HSU-IGF-I-ires-DsRed (**1**) y pC4HSU (**2**). **D.** Niveles de ARNm para IGF-I medidos por qRT-PCR. **E.** ICC contra IGF-I en células transfectadas con pC4HSU-IGF-I-ires-DsRed. Ladder: GeneRuler 1 kb #SM0311/2/3

Capítulo 7. Experimentos propuestos para el futuro: Desarrollo de un novedoso método de terapia celular para incrementar la neurogénesis hipocampal

La principal diferencia de este capítulo con los anteriores es que aquí no se presentan resultados, sino se plantean experimentos futuros. Para concretarlos realizaré una estadía en el laboratorio del Prof. Dr. Benedikt Berninger, de la Universidad de Mainz, Alemania, un investigador líder en reprogramación celular.

7.1. Resumen

Los mamíferos viejos presentan una dramática reducción de la neurogénesis en el hipocampo, una región clave para la formación y consolidación de la memoria [Gonçalves y col., 2016]. Por lo tanto, el desarrollo de terapias novedosas para incrementar la neurogénesis resulta de particular interés.

Durante la década pasada, la tecnología de la reprogramación celular ha revolucionado a las ciencias biológicas. De esta manera, trasplantar neuronas inducidas reprogramadas a partir de células somáticas emerge como una estrategia de punta. En este contexto, nuestro grupo se interesó en la posibilidad de realizar terapia celular para incrementar la neurogénesis en las ratas viejas.

El laboratorio del Dr. Berninger ha sido pionero en estrategias de reprogramación celular desde células somáticas a neuronas inducidas. Particularmente él ha sido el primero en reprogramar una célula somática (astrocito) a una neurona [Berninger y col., 2007] y posee una vasta experiencia en la reprogramación celular con células de ratón. En efecto, su grupo ha logrado reprogramar células gliales a neuronas inducidas por medio de la expresión forzada de factores de transcripción neurogénicos *in vitro* [Heinrich y col., 2010; Heinrich y col., 2011; Karow y col., 2012] e *in vivo* [Heinrich y col., 2014; Gascón y col., 2016].

A pesar de que nuestro objetivo último es realizar terapia celular en el DG de la rata senil, primeramente realizaré en el laboratorio del Dr. Berninger una prueba piloto de trasplante celular en DG ratón adulto- Luego estudiaremos la integración de las mismas a la red hipocampal por IHQ. Posteriormente, transferiré estas técnicas a nuestro laboratorio de Argentina, en donde realizaré un procedimiento similar pero en ratas viejas, las cuales después de la terapia celular serán evaluadas en el BM (Fig. 39)

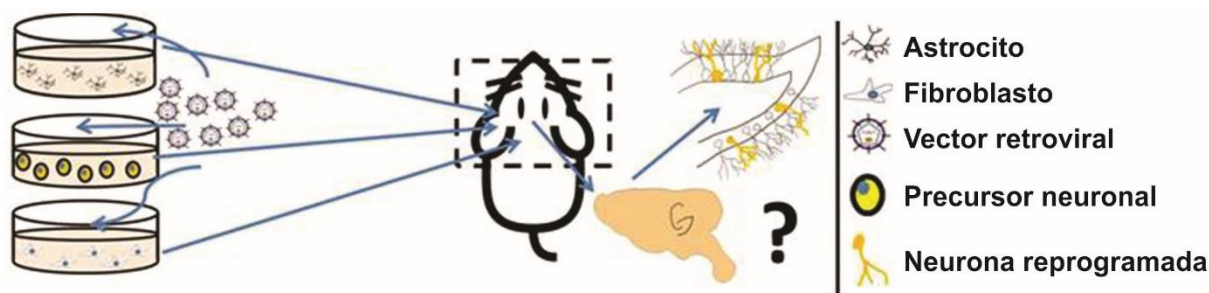


Figura 39. Resumen gráfico.

7.2. Objetivos Específicos

- Trasplantar en el DG de un ratón adulto las siguientes células:
 - Neuronas inducidas a partir de MEFs.
 - Neuronas inducidas a partir de astrocitos del DG de un ratón adulto.
 - NSCs del DG de un ratón adulto.

7.3. Experimentos propuestos

Realizaremos trasplante celular con tres fuentes celulares distintas:

- Neuronas inducidas reprogramadas a partir de MEFs. Esta estrategia es de particular interés ya que los fibroblastos son células somáticas muy distantes de un linaje neural; por lo tanto, esta terapia celular demostraría robustez para protocolos de reprogramación.
- Neuronas inducidas a partir de astrocitos del DG. Debido a que estos astrocitos provienen del ambiente del DG, hipotetizamos que estos podrían ser particularmente susceptibles a ser reprogramados a neuronas inducidas del DG.
- Progenitores neurales obtenidos *ex vivo* por amplificación de NSCs del DG. Si bien esta estrategia no involucra reprogramación celular, planificamos realizarla como un experimento de prueba de concepto. De esta manera, se espera que las células trasplantadas se conviertan en neuronas del GCL de una forma similar a la descrita previamente [Chen y col., 2012].

Más allá de la fuente, a una parte de los cultivos celulares se los fijará y se evaluará por ICC la identidad celular. A la otra parte, se lo tripsinizará y las células serán trasplantadas al DG de un ratón adulto (**Fig 40**).

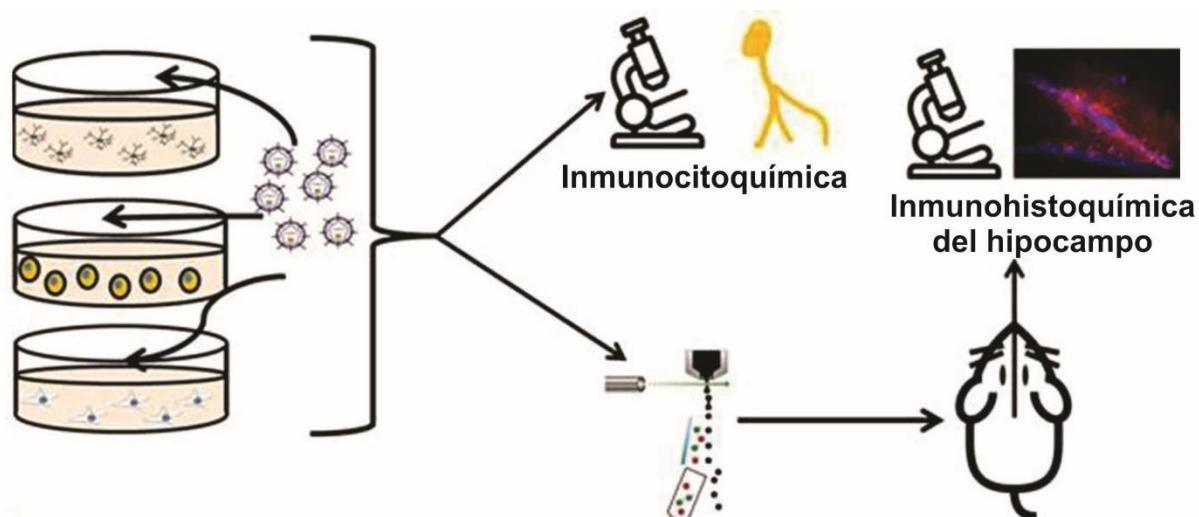


Figura 40. Esquema de la metodología propuesta para nuestros experimentos

7.3.1. Experimento 1: Reprogramación y trasplante de MEFs

Este experimento consiste en reprogramar MEFs a neuronas de la GCL, las cuales serán luego trasplantadas al DG de un ratón adulto. El protocolo de reprogramación consistirá en transducir MEFs con vectores retrovirales codificantes para los genes *Neurog2* y *Prox1*. La expresión forzada de *Neurog2* ha demostrado ser una herramienta efectiva para reprogramar células somáticas a neuronas [Aravantinou-Fatorou y col., 2015; Ladewig y col., 2012]. Además, el perfil de las neuronas de la GCL está improntado por la expresión del factor de transcripción *Prox1* [Yu y col., 2014].

Los MEFs serán obtenidos de embriones de ratón E14 como se describió previamente [Vierbuchen y col., 2010]. Para la reprogramación celular, utilizaremos un protocolo ya descrito por el laboratorio del Dr. Berninger [Gascón y col., 2016]. Los MEFs serán transducidos con 2 vectores retrovirales: el **RV-CAG-Neurog2-RFP**, codificante para *Neurog2* y RFP (Proteína fluorescente roja) y, el **RV-CAG-Prox1-GFP**, codificante para *Prox1* y GFP. Por lo tanto, los MEFs co-transducidos expresarán fluorescencia verde y roja. El cultivo será monitoreado con microscopía de campo claro y de epifluorescencia. Cuando las células co-transducidas presenten morfología neuronal, serán separadas en 2 partes:

Una parte será fijada y procesada para ICC como se ha descrito previamente [Gascón y col., 2016]. Se utilizarán anticuerpos primarios contra los siguientes marcadores: GFP y RFP para marcar células co-transducidas, marcadores neuronales (β -III-tubulin, Map2 y NeuN) y un marcador glutamatérgico (v-GluT1), debido a que las neuronas de la GCL son glutamatérgicas. Luego, las células serán incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a

fluróforos hechos en la especie adecuada. Finalmente se montarán los preparados con Aqua Poly/Mount.

La parte restante del cultivo será utilizada para trasplante celular. Para este fin, las células serán tripsinizadas y purificadas de acuerdo a su fluorescencia verde y roja por citometría de flujo. Luego, 10^4 células serán colectadas y trasplantadas unilateralmente a un ratón adulto mediante un aparato estereotáxico. Para acceder al DG, las coordenadas de inyección relativas al Bregma serán: anteroposterior: -2.1; lateral: +1; dorsoventral: -2.05. Cuatro semanas después del trasplante, los ratones serán sacrificados y sus cerebros procesados para IHQ y microscopia confocal como se ha descrito previamente por el grupo del Dr. Berninger [Bergami y col., 2015]. Secciones coronales de los cerebros serán incubadas con anticuerpos primarios contra: GFP (para localizar neuronas derivadas de células transducidas con GFP), RFP (para localizar neuronas derivadas de células transducidas con RFP), DCX (neuronas inmaduras), NeuN (neuronas maduras), β -III tubulina (microtúbulos de neuronas), vGluT1 (para evaluar identidad glutamatérgica), GAD65/67 (para evaluar identidad GABAérgica, la cual no se espera), Sinaptofisina (para marcar terminales pre-sinápticas, lo cual demostraría que las neuronas inducidas se integran a la red hipocámpal), y PSD95 (para marcar terminales post-sinápticas, lo cual demostraría que las neuronas inducidas se integran a la red hipocámpal). Después, las secciones se incubarán con anticuerpos secundarios adecuados conjugados a fluoróforos, serán teñidas con DAPI y montadas en portaobjetos para observación al microscopio.

7.3.2. Experimento 2: Reprogramación y trasplante de astrocitos

El DG de ratones P5-7 será disecado y se obtendrán cultivos primarios de astrocitos con un procedimiento descrito previamente [Heinrich y col., 2010; Heinrich y col., 2011]. La reprogramación celular será realizada con los mismos vectores mencionados en 7.3.1. El protocolo de reprogramación será uno ya descrito previamente por el laboratorio del Dr. Berninger [Heinrich y col., 2011]. Luego, el cultivo será dividido en 2 partes: una para ICC y la otra para el trasplante de la misma manera a la descrita en 7.3.1.

7.3.3. Experimento 3: Amplificación *ex vivo* de NSCs del DG y trasplante

Este experimento será realizado tomando ventaja de un protocolo previamente descrito para ratas [Chen y col., 2012]. Brevemente, el DG de ratones P5-7 será disecado y sus NSCs

obtenidas serán amplificadas. Después de la adición de EFG (factor de crecimiento epidérmico) y FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) al medio de cultivo, se espera que las NSCs se conviertan en precursores neuronales. En este estadio, las células serán marcadas por transducción con un vector retroviral RV-CAG-GFP. Finalmente, el cultivo será dividido en 2 partes para ICC y trasplante de una forma similar a la descrita en 7.4.1. Sin embargo, para este experimento en particular, solamente las células que expresen GFP serán colectadas y trasplantadas. Además, para este cultivo de precursores neuronales, la ICC será realizada para evaluar identidad celular con los siguientes marcadores: GFP (para localizar células derivadas de una célula transducida con GFP), GFAP (marcador de precursores neuronales), Nestin (marcador de precursores neuronales), DCX (marcador de neuronas inmaduras) y NeuN (marcador de neuronas maduras).

7.4. Resultados esperados

El principal objetivo de estos experimentos propuestos es combinar la reprogramación celular con la terapia celular. Esperamos observar que las neuronas trasplantadas se incorporan exitosamente a la red neuronal del hipocampo.

Por último, trasladaré el *know how* de las técnicas empleadas en el laboratorio del Dr. Berninger a nuestro laboratorio en Argentina. Subsecuentemente, planificamos llevar a cabo terapia celular en el hipocampo de ratas viejas, las cuales serán finalmente evaluadas en el BM.

Capítulo 8. Consideraciones finales y conclusiones

Encontrar una estrategia adecuada para estudiar el envejecimiento es, en el mejor de los casos, desafiante. Una aproximación válida podría ser estudiar cómo envejecen las neuronas en una placa de cultivo [Lesuisse y col., 2002], alternatively, se puede estudiar el envejecimiento de animales durante toda su vida, para lo cual modelos de corta vida, como *Caenorhabditis Elegans* y *Drosophila Melanogaster* son imprescindibles. Para facilitar la tarea, es común estudiar animales a distintas edades, ya sea tomando muestras de humanos de una colección de biopsias o, como hacemos nosotros, directamente experimentando con pequeños roedores, los cuales típicamente viven alrededor de 3 años.

Un problema surge por la posible interferencia del sexo del modelo de envejecimiento utilizado. En nuestro laboratorio históricamente hemos abordado la temática del envejecimiento estudiando la rata hembra SD vieja de nuestra colonia, el motivo de esto es que son de óptima manutención y viven hasta la senilidad con menos problemas de salud que las ratas macho de la misma cepa. Para esta tesis, a la hora de comparar el proceso del envejecimiento *per se* hemos comparado a las ratas viejas (28 meses) con sus contrapartes jóvenes (2 meses). Una vez caracterizados los cambios que se dan con el envejecimiento, hemos implementado terapia génica con IGF-I y evaluado una restauración para esos cambios. En este caso el punto de comparación ha sido un grupo de animales de la misma cohorte tratados con un vector control. Desde este punto de vista, nuestros diseños experimentales parecen aceptables y han sido revisados por pares con opiniones favorables.

En el año 2011, el Dr. Gustavo Morel implementó su iniciativa de poner a punto el BM en nuestro laboratorio. Desde el primer estudio de nuestro laboratorio utilizando este test [Morel y col., 2015], hemos ido adaptando el paradigma de acuerdo a las preguntas experimentales del momento. De este modo, realizamos un protocolo corto (*capítulo 4*) en un primer experimento de terapia génica a corto plazo. Aquí, si bien observamos ciertos efectos restaurativos de la terapia en la memoria, llegamos a la conclusión que los animales viejos necesitan un aprendizaje intenso para tener un buen desempeño en los desafíos PT. Por lo tanto, posteriormente hemos modificado nuestros protocolos en haras de darles sesiones de entrenamiento más extensas (*capítulo 3 y 5*). Basta observar los parámetros de comportamiento, sea latencia, errores o exploraciones, para constatar lo beneficiosos que han sido los protocolos intensos de los *capítulos 3 y 5*, respecto a aquel del *capítulo 4*. Además de esto, en el marco de esta tesis, seguimos avanzando sobre las bases del paradigma. Como se explica en el *capítulo 2*, el BM tiene ciertos límites, y el impacto que puede tener sobre el

cerebro de la rata no es despreciable. Hemos demostrado que las ratas de nuestro laboratorio pueden realizar un máximo de 3 PTs en un experimento. Más allá de este punto, las ratas intentan escapar del laberinto, pero no de una manera que nos permita evaluar su memoria espacial. Por este motivo, hemos restringido nuestros protocolos a 2 (*capítulo 3*) o 3 PTs (*capítulo 5*).

Un aspecto muy notable que también se ha demostrado es que en principio una rata que fuera sometida a un test cognitivo, a priori 'inocuo', es naive, al menos en el sentido que no fue sometida a ningún tratamiento, cirugía ni estrés. Sin embargo, en el *capítulo 2* demostramos el prominente desarrollo de espinas dendríticas en ratas entrenadas, lo cual indica que no pueden utilizarse como un animal control intacto para otros experimentos, al menos de neurociencias.

En lo que al transcriptoma hipocampal respecta, de acuerdo a nuestros datos, en general la subexpresión génica prevalece (*capítulo 3*), este rasgo parece haberse revertido con la terapia génica, en donde se encontró que se indujeron más genes de los que se reprimieron (*capítulo 5*). Más allá de esta generalidad, hemos observado que los genes subexpresados en las ratas viejas no se restauran a un nivel de expresión mayor con la terapia, sino más bien son otro tipo de genes los que se inducen, y estos a su vez, inducen a otros genes más. Sin duda, el envejecimiento conlleva a una constelación de cambios en el transcriptoma del hipocampo; la relación de estos cambios con el fenotipo del animal envejecido no son evidentes y necesita más investigación. Por el contrario, los cambios en el transcriptoma hipocampal ocasionados por el IGF-I parecen ser más específicos y congruentes con las funciones pleiotrópicas de esta molécula. En este sentido, la terapia tuvo un impacto en ciertos genes relacionados a neurogénesis, fortalecimiento de sinapsis y clivaje del péptido β amiloide.

A nivel morfológico, en el estudio de terapia génica a corto plazo (*capítulo 4*) observamos que el IGF-I incrementa en cierta medida la tasa de neurogénesis en las ratas viejas, esto está reforzado por la inducción observada en el transcriptoma de ratas viejas tratadas del estudio de largo plazo (*capítulo 5*). Por otra parte, la terapia de corto plazo disminuyó el recuento de astrocitos en el hipocampo, así como incrementó su arborescencia proximal. En el envejecimiento, los astrocitos se activan [Rozovsky y col., 2005], probablemente en compensación a su pérdida de arborescencia y falla de función trófica [Morel y col., 2015]. Respecto a esto, el estudio de terapia génica a corto plazo ha tenido un efecto restaurador, sin embargo este debe tomarse con cautela, ya que el estudio de las diversas funciones de los astrocitos está en auge [Perea y col., 2009].

En el hipocampo viejo de rata y del humano se sobreexpresan 11 genes relacionados a una respuesta inmune exacerbada (impronta transcriptómica de los 11 genes). Como tal, la mayoría de estos genes son expresados por la microglia, células del linaje blanco responsables de la acción del sistema inmune en el SNC. Este cambio transcriptómico ha sido evidenciado en nuestros estudios por la presencia de infiltrados de células microgliales reactivas (marcadas para Iba-1) en el hipocampo. Interesantemente, en el estudio de terapia a largo plazo observamos una tendencia muy clara a disminución del recuento de microglia en el hipocampo. En este sentido, estudios posteriores con un número mayor de animales podrían establecer que el IGF-I ejerce una acción antiinflamatoria impidiendo el reclutamiento de células efectoras de la inmunidad. Para estudios de terapia génica futuros, vectores virales bicistronicos nos facilitarán la tarea de detectar a las células productoras de IGF-I recombinante por simple identificación microscópica de emisión de fluorescencia.

Desde hace una década, los descubrimientos sobre reprogramación celular han revolucionado a las ciencias biomédicas, permitiendo la posibilidad de implementación de medicina regenerativa personalizada. Respecto a esto, está en nuestros planes para el futuro inmediato realizar terapia celular en el hipocampo de la rata vieja con neuronas inducidas reprogramadas a partir de células somáticas de la misma rata. Para esto, realizaré una estadia de investigación en el laboratorio del Dr. Berninger, en Alemania, desde donde incorporaré la tecnología de reprogramación celular a neuronas para aplicarla en nuestro laboratorio.

En suma, concluimos que el test de Barnes es una herramienta útil para evaluar la memoria espacial en ratas viejas, aunque se debe elegir un protocolo adecuado para que los efectos del aprendizaje no interfieran en la interpretación de los resultados experimentales. El envejecimiento conlleva un cambio radical en el hipocampo de la rata, ya sea a nivel morfométrico o de transcriptoma. En este sentido la terapia génica icv ha resultado una herramienta efectiva para mejorar la memoria espacial en la rata vieja, lo cual sugerimos se relaciona con la modulación de genes hipocampales con función en la sinapsis, entre otros. Futuros experimentos con vectores virales bicistronicos y con terapia celular ampliarán nuestra línea de investigación del cerebro de la rata vieja.

Bibliografía

- Abe M, Bonini NM. MicroRNAs and neurodegeneration: role and impact. *Trends Cell Biol.* 2013. 23(1):30-6.
- Åberg MA, Åberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000. 20, 2896-2903
- Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature.* 1965. 207, 953–956.
- Amaral D, Lavenex P. "Ch 3. Hippocampal Neuroanatomy". In Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-510027-3. 2006.
- Anders S, Pyl PT, Huber W.. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015. 31:166-169
- Aravantinou-Fatorou K, Ortega F, Chroni-Tzartou D, Antoniou N, Pouloupoulou C, Politis PK, Berninger B, Matsas R, Thomaidou D. CEND1 and NEUROGENIN2 Reprogram Mouse Astrocytes and Embryonic Fibroblasts to Induced Neural Precursors and Differentiated Neurons. *Stem Cell Reports.* 2015. Sep 8; 5(3):405-18.
- Ayer-le Lievre C, Stahlbom PA, Sara VR. Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development.* 1991. 111, 105–115.
- Bach LA, Headey SJ, Norton RS. IGF-binding proteins — the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005. 16, 228–234.
- Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D. Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Mol. Brain Res.* 1991. 10, 43–48.
- Barnes CA, McNaughton BL. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav Neurosci.* 1985. Dec;99(6):1040-8.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1979. 93, 74–104.
- Barnes, CA. Spatial cognition and functional alterations of aged rat hippocampus. In Wang, E. & Snyder, D.S. (eds). *Handbook of the Aging Brain*. Academic Press, New York, pp. 51-66. 1998.

- Baron-Van EA, Olichon-Berthe C, Kowalski A, Visciano G, Van, OE. Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci. Res.* 1991. 28, 244–253.
- Basarkar A, Singh J. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *Int J.Nanomedicine.* 2007. 2(3):353-60. Review.
- Baumgart M, Groth M, Priebe S et al. Age-dependent regulation of tumor-related microRNAs in the brain of the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech. Ageing Dev.* 2012. 133(5):226-33.
- Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One.* 2010. Nov 15;5(11):e13993.
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepen SA. Coordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Mol. Brain Res.* 1998. 59, 119-134.
- Berchtold NC, Cribbs DH, Coleman PD, Rogers J, Head E, Kim R, Beach T, Miller C, Troncoso J, Trojanowski JQ, Zielke HR, Cotman CW. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc natl Acad Sci USA.* 2008. 105: 15605-15610.
- Bergami M, Masserdotti G, Temprana SG, Motori E, Eriksson TM, Göbel J, Yang SM, Conzelmann KK, Schinder AF, Götz M, Berninger B. A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron.* 2015. Feb 18; 85(4):710-7.
- Bergen JM, Park IK, Horner PJ, Pun SH. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. *Pharm Res.* 2008. May 25(5):983-98. Epub 2007 Oct 12. Review.
- Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Götz M. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci.* 2007. Aug 8;27(32):8654-64.
- Bischofberger J, Schmidt-Hieber C, Jonas P. Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J Physiol.* 2008. 1;586(7):1849-57.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci.* 2003. 23 : 3807–3819.
- Block ML, Zecca L, Hong, JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Rev Neurosci.* 2007. 8 : 57-69.

- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL and Song H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*. 2011. 145:1142-1155.
- Bondy CA. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci*. 1991. 11, 3442–3455.
- Bondy CA, Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol. Endocrinol*. 1990. 4, 1386–1398.
- Bossy B, Bossy-Wetzel E, Reichardt LF. Characterization of the integrin $\alpha 8$ subunit: a new integrin $\beta 1$ -associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal laminae in chick embryos. *EMBO J*. 1991. 10:2375–2385.
- Breese CR, D'Costa A, Rollins YD, Adams C, Booze RM, Sonntag WE, Leonard S. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF-binding protein 2(IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol*. 1996. 369, 388-404.
- Burger C, Lopez MC, Baker HV, Mandel RJ, Muzyczka N. Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*. 2008. 89 (4): 379–96.
- Burger C, Lopez MC, Feller JA, Baker HV, Muzyczka N, Mandel RJ. Changes in transcription within the CA1 field of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Learn Mem*. 2007. 87 (1): 21–41.
- Cacicedo L, Martinez-Murillo R. Insulin-like growth factor I-immunoreactive peptide in adult human cerebellar Purkinje cells: co-localization with low-affinity nerve growth factor receptor. *Neuroscience*. 1994. 59, 641–650.
- Calhoun ME, Kurth D, Phinney AL, Long JM, Hengemihle J, Mouton PR, Ingram DK and Jucker M. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiology of aging*. 1998. 19; 6, 599-606.
- Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I. Therapeutic actions of insulin like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2006; 27: 1250-7.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Alemán I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000. 20, 2926–2933.
- Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I. Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like

neuropathology in rodents: New cues into the human disease? *Neurobiol. Aging*. 2006. 27,1618-1631.

- Chan C-S, Chen H, Bradley A, Dragatus I, Rosenmund C, Davis RL. α 8-integrins are required for Hippocampal Long-Term Potentiation but not for Hippocampal-Dependent Learning. *Genes, brain, and behavior*. 2010. 9(4):402-410.
- Chen X, Lepier A, Berninger B, Tolkovsky AM, Herbert J. Cultured subventricular zone progenitor cells transduced with neurogenin become mature glutamatergic neurons and integrate into the dentate gyrus. *PLoS One*. 2012. 7(2):e31547.
- Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan P, Koistinaho J, Swanson R. Astrocytes Protect neurons from nitric oxide toxicity by glutathione-dependent mechanism *J. Neurochem*. 2001. Vol. 77 (6) 1601.
- Cheng XR, Cui XL, Zheng Y, Zhang GR, Li P, Huang H, Zhao YY, Bo XC, Wang SQ, Zhou WX, Zhang YX. Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model. *Front. Aging Neurosci*. 2013. 29;5:65.
- Colasante G, Lignani G, Rubio A, Medrihan L, Yekhlief L, Sessa A, Massimino L, Giannelli SG, Sacchetti S, Caiazzo M, Leo D, Alexopoulou D, Dell'Anno MT, Ciabatti E, Orlando M, Studer M, Dahl A, Gainetdinov RR, Taverna S, Benfenati F, Broccoli V. Rapid Conversion of Fibroblasts into Functional Forebrain GABAergic Interneurons by Direct Genetic Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2015. Dec 3;17(6):719-34.
- Compton DM. Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav Processes*. 2004. Nov 30;67(3):335-42.
- Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M? *Nat Rev Neurosci*. 2002. Feb;3(2):153-60.
- D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*. 1980; 75:315–28.
- de Toledo-Morrell L, Morrell F, Fleming. Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling. *Behav Neurosci*. 1984. 98, 902-907.
- DeFelipe J, Fairén A. Synaptic connections of an interneuron with axonal arcades in the cat visual cortex. *J Neurocytol*. 1988 Jun;17(3):313-23.
- Dell'Anno MT, Caiazzo M, Leo D, Dvoretzkova E, Medrihan L, Colasante G, Giannelli S, Theka I, Russo G, Mus L, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Benfenati F, Taverna S, Dityatev A, Broccoli V. Remote control of induced dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *J Clin Invest*. 2014. Jul;124(7):3215-29.

- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. 1994 Mar 18;269(11):8445-54.
- Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Garcia-Segura LM. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflam*. 2012. 9:71- 80.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013. 29 :15-21.
- Dore S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 protects and rescues hippocampal neurons against amyloid- and amylin-induced toxicity. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*. 1997. 94, 4772-4777.
- Dou D, Joseph R. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2–12: the deduced protein is a novel ‘proteolipid’. *Brain Res*. 1996. 723: 8–22.
- Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol*. 2011. 14: 392–399.
- Dubé ID, Cournoyer D. Gene therapy: here to stay. *CMAJ*. 1995 May15;152(10):1605-13. Review.
- Ebert AD, Beres AJ, Barber AE, y cols. Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2008. 209: 213-23.
- Eda A., Takahashi M., Fukushima T, Hohjoh H. Alteration of microRNA expression in the process of mouse brain growth. *Gene*. 2011. 485, 46–52.
- Ehrenborg E, Zazzi H, Lagercrantz S et al. Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mamm Genome*. 1999. Apr;10(4):376-80.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2011. May 6;8(5):566-79.
- Fernandez AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:1253-8.
- Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci*. 2012. 13, 225-239.

- Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 2002. 23, 824–854.
- Garcia JV, Stoppelli MP, Thompson KL, Decker SJ, Rosner MR. Characterization of a *Drosophila* protein that binds both epidermal growth factor and insulin-related growth factors. *J. Cell Biol.* 1987. 105, 449–456.
- Gascón S, Murenu E, Masserdotti G, Ortega F, Russo GL, Petrik D, Deshpande A, Heinrich C, Karow M, Robertson SP, Schroeder T, Beckers J, Irmeler M, Berndt C, Angeli JP, Conrad M, Berninger B, Götz M. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2016. Mar 3;18(3):396-409.
- Geinisman Y, Bondareff W, Dodge JT. Hypertrophy of astroglial processes in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat.* 1978 Dec;153(4):537-43.
- Genis L, Dávila D, Fernandez S, Pozo-Rodrigálvarez A, Martínez-Murillo R, TorresAleman I. Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000 Res* 3:28. 2014.
- Gibb R1, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 1998 Jan 31; 79(1):1-4.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron.* 1999. 23:257–271.
- Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol.* 1973 Feb;82(2):175-81.
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016. Nov 3;167(4):897-914.
- Goodrich-Hunsaker NJ, Hunsaker MR, Kesner RP. The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav Neurosci.* 2008 Feb;122(1):16-26.
- Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6A):2263-80. Review.
- Guan J, Skinner SJ, Beilharz EJ, Hua KM, Hodgkinson S, Gluckman PD, Williams CE. The movement of IGF-1 into the brain parenchyma after hypoxic–ischaemic injury. *Neuroreport.* 1996. 7, 632–636.
- Han VK, Lund PK, Lee DC, D’Ercole A J. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988. 66, 422–429.

- Hansen LA, Armstrong DM, Terry RD. An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 1987. Jan-Feb;8(1):1-6.
- Hawkes C, Kar S. The insulin-like growth factor-II/ mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 2004. 44, 117–140.
- Hawkes C, Jhamandas JH, Harris KH, Fu W, MacDonald RG, Kar S. Single transmembrane domain insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor regulates central cholinergic function by activating a G-protein-sensitive, protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci*. 2006 Jan 11;26(2):585-96.
- Heinrich C, Blum R, Gascón S, Masserdotti G, Tripathi P, Sánchez R, Tiedt S, Schroeder T, Götz M, Berninger B. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol*. 2010. May 18; 8(5):e1000373.
- Heinrich C, Spagnoli FM, Berninger B. In vivo reprogramming for tissue repair. *Nat Cell Biol*. 2015. Mar; 17(3):204-11.
- Heinrich C, Gascón S, Masserdotti G, Lepier A, Sanchez R, Simon-Ebert T, Schroeder T, Götz M, Berninger B. Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nat Protoc*. 2011. Feb;6(2):214-28.
- Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D et al. Restorative effect of Insulin-like Growth Factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther*. 2007. 14: 237-245.
- Hereñú CB, Sonntag WE, Morel GR, Portiansky EL, Goya RG. The ependymal route for insulin like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience*. 2009. 163: 442-447.
- Hereñú CB, Sonntag WE, Morel GR, Portiansky EL, Goya RG. The ependymal route for insulin like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience*. 2009. 163, 442-447.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J. The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing. *Nat Neurosci*. 2013. 16: 1896–1905.
- Himeda T, Mizuno K, Kato H, Araki T. Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech. Ageing Dev*. 2005. 126 (6–7), 673–677.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology, 2nd Edn. Garly Science/BIOS Scientific Publishers, Oxon, UK. 2005.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev*. 1999. 20, 761–787.

- Hynes MA, Brooks PJ, Van Wyk JJ, Lund P K. Insulin-like growth factor II messenger ribonucleic acids are synthesized in the choroid plexus of the rat brain. *Mol. Endocrinol.* 1988. 2, 47–54.
- Inukai S, de Lencastre A, Turner M, Slack F. Novel microRNAs mndifferentially expressed during aging in the mouse brain. *PLoS ONE.* 2012. 7, e40028.
- Jablonka S, Holtmann B, Sendtner M, y cols. Therapeutic effects of PEGylated insulin-like growth factor I in the pmn mouse model of motoneuron disease. *Exp Neurol.* 2011; 232: 261-9.
- Jiang T, Yu JT, Tan L. Novel disease-modifying therapies for Alzheimer’s disease. *J Alz Dis.* 2012. 31: 475-492.
- Joseph R, Dou D, Tsang W. Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994. 201:1227–1234.
- Joseph R, Dou D, TsangW. Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene. *Brain Res.* 1995. 690: 92–98.
- Kagitani F, Kuroiwa Y, Wakana S et al. Peg5/Neuronatin is an imprinted gene located on sub-distal chromosome 2 in the mouse. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 3428–3432.
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T. Principles of neural science, 4th Edition. Ed McGrew Hill. 2000.
- Karow M, Sánchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, Gascón S, Khan MA, Lie DC, Dellavalle A, Cossu G, Goldbrunner R, Götz M, Berninger B. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell.* 2012. Oct 5;11(4):471-6.
- Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT Jr, LeRoith D. Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol.* 1994 Jan;8(1):40-50.
- Kempermann G, Gage FH. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus.* 1999;9(3):321-32.
- Kim J, Yoon H, Chung DE, Brown JL, Belmonte KC, Kim J. miR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE1 expression. *Journal of neurochemistry.* 2016. 137:436–445.
- Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, y cols. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic

fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci.* 1990; 10: 558-70.

- Kuhn HG, Dickinson-Anson H and Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996. 16:2027-2033.
- Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms S, Wernet P, Kögler G, Müller FJ, Koch P, Brüstle O. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods.* 2012. Jun;9(6):575-8.
- Laron Z, Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958–2003. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 1031–44.
- Lau P, Bossers K, Janky R et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* 2013. 5(10):1613-34.
- Lee WH, Michels KM, Bondy CA. Localization of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA during postnatal brain development: correlation with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience.* 1993. 53, 251–265.
- Lee WH, Wang GM, Seaman LB, Vannucci SJ. Coordinate IGF-I and IGFBP5 gene expression in perinatal rat brain after hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996. 16, 227–236.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, y cols. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995; 16:143–63.
- Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol.* 2002 Apr;51(1):9-23.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009. 15;25(16):2078-9.
- Li X, Khanna A, Li N, Wang E. Circulatory miR34a as an RNAbased, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging.* 2011. 3(10):985-1002.
- Li XS, Williams M, Bartlett WP. Induction of IGF-1 mRNA expression following traumatic injury to the postnatal brain. *Mol. Brain Res.* 1998. 57, 92–96.
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience.* 2001;107(4):603-13.
- Li-Hong Long, Rui-Li Liu, Fang Wang, Jue Liu, Zhuang-Li Hu, Na Xie, You Jin, Hui Fu, Jian Guo Chen. Age-related synaptic changes in the ca1 stratum radiatum and spatial learning

impairment in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009. 36, 675–681.

- Lindsey JD, Landfield PW, Lynch G. Early onset and topographical distribution of hypertrophied astrocytes in hippocampus of aging rats: a quantitative study. *J Gerontol*. 1979 Sep;34(5):661-71.
- Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D as a therapeutic target in brain disorders. *Neuropsychopharm*. 2012. 37: 301–302 .
- Ling GS, Bennett J, Woollard KJ, Szajna M, Fossati-Jimack L, Taylor PR, Scott D, Franzoso G, Cook HT, Botto M. Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. *Nat Commun*. 2014. 5:3039-3050.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007. 114:97-109.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014. 15 : 550-570
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992. 70 : 431–442.
- Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009. 64 : 110-122 .
- Luo XG, Ding JQ, Chen SD. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodeg*. 2010. 5:12 -20.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience*. 1998 Dec;87(3):559-69.
- Matuoka K, Shibata M, Yamakawa A, Takenawa T. Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc natl Acad Sci USA*. 1992. 89: 9015–9029.
- McKelvie PA, Rosen KM, Kinney HC, Villa-Komaroff L. Insulin-like growth factor II expression in the developing human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992. Jul;51(4):464-71.
- Merimee T, Laron Z. Growth hormone, IGF-I and growth: new views of old concepts. In: Merimee T, Laron Z, Eds. *Modern endocrinology and diabetes*, Vol. 4.: Freund Publishing House Ltd: London-Tel Aviv. 1996; PP. 5-10.
- Morel GR, Andersen T, Pardo J, Zuccolilli GO, Cambiaggi VL, Hereñú CB, Goya

RG. Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*. 2015 Sep 10;303:189-99.

- Morgado Bernal I. Aprendizaje y memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. Viguera Editores, S.L.U. 2015.
- Morgan TE, Xie Z, Goldsmith S, Yoshida T, Lanzrein AS, Stone D, Rozovsky I, Perry G, Smith MA, Finch CE. The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction. *Neuroscience*. 1999. Mar;89(3):687-99.
- Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1984. 11, 47–60.
- Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*. 2002;63(4):317-32. Review.
- Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*. 2002 Nov 22;956(1):30-5.
- Naghdi N, Majlessi N, Bozorgmehr, T. The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behav. Brain Res*. 2003. 139 (1–2), 69–73.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci*. 2004. 5(5):361-72.
- Neal-Perry G, Nejat E, Dicken C. The neuroendocrine physiology of female reproductive aging: An update. *Maturitas* 2010; 67: 34–8.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging*. 1993. Sep-Oct;14(5):421-9.
- Nishida F, Morel GR, Hereñú CB, et al. Restorative effect of intracerebroventricular Insulin-like Growth Factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience*. 2011; 177: 195-206.
- Nishijima, T. y cols. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*. 2010. 67, 834–846.
- Norden DM, Godbout JP. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013. 39: 19–34.
- O’Keefe J, Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford: Oxford University Press; 1978.
- Ocran I, Fay CT, Parmelee JT. Characterization of insulin-like growth factor

binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 1990 Sep;127(3):1260-7.

- Offen D, Shtail B, Hadad D, Weizman A, Melamed E, Gil-Ad I. Protective effect of insulin-like-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2001. Dec 28;316(3):129-32.
- Oka K, Chan L. Helper-dependent adenoviral vectors. *Curr Protoc Hum Genet*. Ch 12: Unit 12.13. 2005.
- Oyang EL, Davidson BC, Lee W, Poon MM. Functional characterization of the dendritically localized mRNA neuronatin in hippocampal neurons. *PLoS One*. 2011. 6(9):e24879.
- Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub*. 2012 Jun;24(2):152-8.
- Pardo J, Abba MC, Lacunza E, Ogundele OM, Paiva I, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Jun 22.
- Pardo J, Abba MC, Lacunza E, Francelle L, Morel GR, Outeiro TF, Goya RG. Identification of a conserved gene signature associated with an exacerbated inflammatory environment in the hippocampus of aging rats. *Hippocampus*. 2017 Apr;27(4):435-449.
- Pardo J, Uriarte M, Cónsole GM, Reggiani PC, Outeiro TF, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *Eur J Neurosci*. 2016 Aug;44(4):2120-8.
- Pardo J, Morel GR, Astiz M, Schwerdt JI, León ML, Rodríguez SS, Hereñú CB, Goya RG. Gene therapy and cell reprogramming for the aging brain: achievements and promise. *Curr Gene Ther*. 2014 Feb;14(1):24-34. Review.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego. 1998.
- Pei Z, Pang H, Qian L, Yang S, Wang T, Zhang W, Wu X, Dallas S, Wilson B, Reece JM, Miller DS, Hong JS, Block M. MAC1 mediates LPS induced production of superoxide by microglia: the role of pattern recognition receptors in dopaminergic neurotoxicity. *Glia*. 2007. 55:1362–1373.
- Peng X, Frohman MA. Mammalian Phospholipase D Physiological and Pathological Roles. *Acta Physiol*. 2012. 204 : 219–226.

- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss Tim, O'Keefe J. The Hippocampus book. Oxford University Press. 2007.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009 Aug;32(8):421-31.
- Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG . EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature.* 2009. 460 : 1122–1126.
- Péron S, Berninger B. Reawakening the sleeping beauty in the adult brain: neurogenesis from parenchymal glia. *Curr Opin Genet Dev.* 2015 Oct;34:46-53.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010. 6: 193-201.
- Persengiev S, Kondova I, Otting N, Koeppen A H, Bontrop RE. Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis. *Neurobiol. Aging.* 2011. 32(2316), e2317–e2327.
- Persengiev SP, Kondova II, Bontrop RE. The impact of microRNAs on brain aging and neurodegeneration. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2012. 2012:359369.
- Peters A, Rosene DL, Moss MB, Kemper TL, Abraham CR, Tigges J, Albert MS. Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Aug;55(8):861-74.
- Pham NV, Nguyen MT, Hu JF, Vu TH, Hoffman AR. Dissociation of IGF2 and H19 imprinting in human brain. *Brain Res.* 1998. Nov 9;810(1-2):1-8.
- Piatti VC, Espósito MS, Schinder AF. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist.* 2006. 12(6):463-8.
- Poon MM, Choi SH, Jamieson CA, Geschwind DH, Martin KC. Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006. 26: 13390–13399.
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2001 Sep;58(9):1395-402.
- Puntel M, Muhammad AK, Candolfi M, Salem A, Yagiz K, Farrokhi C, Kroeger KM, Xiong W, Curtin JF, Liu C, Bondale NS, Lerner J, Pechnick RN, Palmer D, Ng P, Lowenstein PR, Castro MG. A novel bicistronic high-capacity gutless adenovirus vector that drives constitutive expression of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and tet-inducible expression of Flt3L for glioma therapeutics. *J Virol.* 2010 Jun;84(12):6007-17.

- Quesada A, Micevych PE. Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxidopamine lesions. *J Neurosci Res.* 2004; 75:107- 16.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci.* 2005. Jan;21(2):464-76.
- Rao YS, Mott NN, Wang Y, Chung WC, Pak TR. MicroRNAs in the aging female brain: a putative mechanism for age-specific estrogen effects. *Endocrinology.* 2013. 154(8):2795-806.
- Rapp PR, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93, 9926-9930.
- Rasmussen T, Schliemann T, Sørensen JC, Zimmer J, West MJ. Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging.* 1996 Jan-Feb;17(1):143-7.
- Ravindranath V, Dang HM, Goya RG, Mansour H, Nimgaonkar VL, Russell VA, Xin Y. Regional research priorities in brain and nervous system disorders. *Nature.* 2015. Nov 19;527(7578):S198-206.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010. 26, 139–140.
- Rodriguez SS, Schwerdt JI, Barbeito CG, y cols. Hypothalamic insulin-like growth factor-I gene therapy prolongs estral cyclicity and protects ovarian structure in middle-aged female rats. *Endocrinology.* 2013; 154: 2166-73.
- Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Andersen H, Holst PJ, Kledal TN, Lüttichau HR, Larsen JK, Christensen JP, Schwartz TW. Molecular Pharmacological Phenotyping of EBI2: an orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol Chem.* 2006. 281 : 13199-13208.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 2003. 69 (3), 143–179.
- Rowe WB, Blalock EM, Chen KC, Kadish I, Wang D, Barrett JE, Thibault O, Porter, Rose GM, Landfield PW. Hippocampal expression analyses reveal selective association of immediate-early, neuroenergetic, and myelinogenic pathways with cognitive impairment in aged rats. *J Neurosci.* 2007 Mar 21;27(12):3098-110.
- Rozovsky I, Wei M, Morgan TE, Finch CE. Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP. *Neurobiol Aging.* 2005 May;26(5):705-15.

- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003. 34:374–378.
- Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mech Ageing Dev*. 1999 May 3;108(2):165-72.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*. 2011. Apr 28;472(7344):466-70.
- Sandberg, A. C., Engberg, C., Lake, M., von, H. H. & Sara, V. R. The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci. Lett*. 1988. 93, 114–119.
- Sanguino E, Roglans N, Rodríguez-Calvo R, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Ageing introduces a complex pattern of changes in several rat brain transcription factors depending on gender and anatomical localization. *Exp Gerontol*. 2006. 41:372-379.
- Satoh K, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yokota H, Yamada T. Mitsugumin 29 is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res*. 2012 Mar 2;1441:9-16.
- Schinder AF, Gage FH. "A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function." *Physiology (Bethesda)*. 2004. 19:253-61.
- Schwerdt JI, Lopez-Leon M, Console GM, Brown OA, Morel GR, Spinedi E, Goya RG. Rejuvenating effect of long-term igf-i gene therapy in the hypothalamus of aged rats with dopaminergic dysfunction. *Rejuvenation Res*. 2017 Jul 3.
- Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocmé E, Liljedahl U, Lagergren J, Larsson O. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci Signal*. 2010 Feb 9;3(108):ra10.
- Shabo I, Olsson H, Stål O, Svanvik J. Breast cancer expression of DAP12 is associated with skeletal and liver metastases and poor survival. *Clin Breast Cancer*. 2013 Oct;13(5):371-7.
- Shavali S, Ren J, Ebadi M. Insulin-like growth factor-1 protects human dopaminergic SH-SY5Y cells from Salsolinol-induced toxicity. *Neurosci Lett*. 2003; 340: 79–82.

- Shimasaki S, Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N. Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol*. 1990. Oct;4(10):1451-8.
- Shimuta M, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Nakagawara K, Takeshima H. Structure and expression of mitsugumin29 gene. *FEBS Lett*. 1998. 431, 263–267.
- Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat*. 1953. 87, 387–406.
- Simonato M, Bennett J, Boulis NM, Castro MG, Fink DJ, Goins WF, Gray SJ, Lowenstein PR, Vandenberghe LH, Wilson TJ, Wolfe JH, Glorioso JC. Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013 May;9(5):277-91.
- Somel M, Guo S, Fu N, Yan Z, et al. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res*. 2010. 20(9): 1207–1218.
- Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*. 1980 Dec;107(6):1875-9.
- Sortino MA, Canonico PL. Neuroprotective effect of insulin-like growth factor I in immortalized hypothalamic cells. *Endocrinology*. 1996; 137: 1418-22.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G. The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol*. 1993. 44: 453-95.
- Squire LR, Levy DA, Hopkins RO. Impaired odor recognition memory in patients with hippocampal lesions. *Learn Mem*. 2004. (6):794-6.
- Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, Calogero AE, Listwak SJ, Aksentijevich S, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res*. 1992 Jan 20;570(1-2):54-60.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004. 1:14-17.
- Stylianopoulou F, Herbert J, Soares MB, Efstratiadis A. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):141-5.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2007. Nov;1(5):515-28.

- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006. 126:663–676.
- Tarpy R. Aprendizaje: Teoría e investigación contemporánea. México: McGraw Hill . 2000.
- Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthr Rheum*. 2013. 65: 472–480.
- the adult rat central nervous system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 141–145 (1988).
- Thibault O, Hadley R, Landfield PW. Elevated postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J. Neurosci*. 2001. 21 (24), 9744–9756.
- Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ. Trophic effects of insulin-like growth factor-1 on fetal rat hypothalamic cells in culture. *Neuroscience*. 1990; 35:601-8.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2001. Mar 1;21(5):1628-34.
- Trinchero MF, Koehl M, Bechakra M, Delage P, Charrier V, Grosjean N, et al. Effects of spaced learning in the water maze on development of dentate granule cells generated in adult mice. *Hippocampus*. 2015 Nov; 25(11):1314-26.
- Tulving E. Episodic and semantic memory. En E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organization of memory*, (pp. 381-403). New York: Academic Press. 1972.
- Usui K, Morii R, Tanaka R et al. cDNA cloning and mRNA expression analysis of the human neuronatin. High level expression in human pituitary gland and pituitary adenomas. *J Mol Neurosci*. 1997. 9 55–60.
- Valentino KL, Ocrant I, Rosenfeld RG. Developmental expression of insulin-like growth factor- II receptor immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 1990. 126, 914–920.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000. Dec;1(3):191-8.
- Vargas-Lopez V, Lamprea MR, Muñera A. Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behav Proc*. 2011. 86:30–38.

- Verbitsky M, Yonan AL, Malleret G, Kandel ER, Gilliam TC, Pavlidis P. Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice. *Learn Mem.* 2004. 11 (3): 253–60.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010. Feb 25;463(7284):1035-41.
- Wakselman S, Béchade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci.* 2008. 6: 28:8138-8143.
- Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Logan A. Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology.* 1997 Jul;138(7):3024-34.
- West MJ, Amaral DJ, Rapp PR. Preserved hippocampal cell number in aged monkeys with recognition memory deficits. *Soc. Neuroscience Abstract.* 1999. 19, 599.
- West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging.* 1993 Jul-Aug;14(4):275-85.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1994. Sep 17;344(8925):769-72.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 2006. 313(5790):1093-7.
- Wilkinson TN, Bathgate RA. The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. 612, 1–13.
- Xing J, Titus AR, Humphrey MB. The TREM2-DAP12 signaling pathway in Nasu–Hakola disease: a molecular genetics perspective. *Res Rep Biochem.* 2015. 5: 89–100.
- Yao DL, West NR, Bondy CA, y cols. Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res.* 1995; 40: 647–59.
- Yau SY, Li A, So KF. Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plast.* 2015. 5: 1-13.
- Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, Vegesna R, Kim H, Torres-Garcia W, Treviño V, Shen H, Laird PW, Levine DA, Carter SL, Getz G, Stemke-Hale K, Mills GB, Verhaak RG. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun.* 2013. 4:2612-2622.

- Yu DX, Marchetto MC, Gage FH. How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. *Development*. 2014. Jun;141(12):2366-75.
- Zhang B, Gaiteri C, Bodea LG, Wang Z, McElwee J, Podtelezhnikov AA, Zhang C, Xie T, Tran L, Dobrin R, Fluder E, Clurman B, Melquist S, Narayanan M, Suver C, Shah H, Mahajan M, Gillis T, Mysore J, MacDonald ME, Lamb JR, Bennett DA, Molony C, Stone DJ, Gudnason V, Myers AJ, Schadt EE, Neumann H, Zhu J, Emilsson V. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*. 2013. 153: 707-720.

Apéndice A. Métodos de biología molecular

Cultivo de bacterias y preparación de plásmidos

Para este trabajo, se cultivaron bacterias *Escherichia Coli* de la cepa JM109 y DH5 α , las cuales crecen óptimamente a 37°C. El medio de cultivo fue siempre caldo LB y agar LB, excepto para la transformación de bacterias, para la cual se utilizó medio SOC. Todos los plásmidos aquí presentados contienen el gen para la resistencia a la Ampicilina.

Para la preparación de plásmidos, utilizaron los siguientes kits comerciales y se siguieron las instrucciones del fabricante:

Stratagene Miniprep

Nucleobond PC20

Transformación de bacterias

Las bacterias se transformaron por el método del 'shock térmico'. Presento aquí el protocolo brevemente. Describo los volúmenes utilizados más comunes, estos son inmediatamente extrapolables de forma lineal.

- Agregar a 100 μ l de bacterias competentes 10 ng de ADN en un volumen entre 1 y 5 μ l. Mezclar suavemente.
- Dejar incubar la mezcla ADN-bacterias en hielo por media hora.
- Incubar la mezcla ADN-bacterias a 42°C por un minuto.
- Incubar la mezcla ADN-bacterias en hielo por 2 minutos.
- Agregar a la mezcla ADN-bacterias 400 μ l de medio SOC a temperatura ambiente. Mezclar por inversión.
- Incubar la mezcla con agitación por una hora a 37°C.
- Centrifugar un minuto para que las bacterias queden en el pellet. Descartar sobrenadante (SN), resuspender el pellet con un tip amarillo y plaquear todo el volumen en una placa de Petri con LB-Agar.

Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo con enzimas de FERMENTAS. Las digestiones con endonucleasas de restricción 'Fast Digest' se llevaron a cabo por una hora a

37°C y las ligaciones a 16°C toda la noche. Los protocolos se siguieron de acuerdo a los instructivos del fabricante.

PCR en tiempo final

Para la obtención de amplicones, se utilizó PCR en tiempo final. Para esto, se utilizó la enzima Taq Polimerasa para amplicones cuyo tamaño fuere menor a 1 kb y la enzima Phusion (High Fidelity DNA Polymerase) (Finnzymes) para amplicones de un tamaño mayor. Los parámetros de los ciclos fueron:

30'' a 98°C (desnaturalización inicial)	
15'' a 98°C (desnaturalización)	
30'' a 50-58°C (annealing)	} 32 ciclos
20'' a 72°C (elongación)	
5' a 72°C (elongación final)	

Luego de la PCR, las mezclas de reacción fueron corridas en geles de agarosa, los cuales se revelaron con Bromuro de Etidio. Una vez hallada la banda, esta fue extraída con la punta de un bisturí y el ADN se extrajo con un kit de Stratagene.

Para estas PCR, se utilizaron los siguientes primers:

Nombre del primer	Secuencia (5'--> 3')
ASCI- for	GCGGGCGCGCCGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG
NHE1-for	CGCCGCTAGCGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAG
NHE1 REV	CGCGCTAGCAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
Age1- IGF-I for	GCGACCGGTATGGGGAAAATCAGCAGTCTTC
Mun1- ds RED rev	GCGCAATTGCTACAGGAACAGGTGGTGGCGGCCCT
XbaI-for- IGF-I	GCGTCTAGAATGGGGAAAATCAGCAGTCTTC
EcorRI rev IGF-I wo stop	GGGGAATTCCTTGTGTTCTTCAAGTGTACTTCC
Age1-ires-for	GCGACCGGTGGGATCCTCTAGAGTCGACCT

Cultivo de células HEK293 y transfección de plásmidos

Las células HEK293 se cultivaron con medio DMEM con 10% suero fetal de cabra (SFC). Un día después de plaquear en placas de 6 o 12 wells, las células fueron transfectadas con el método del Fosfato de Calcio (CaPO).

Método CaPO:

A efectos de dar una descripción inequívoca de este método, se describirá el protocolo para transfectar células HEK293 en una placa de 15 cm, cuya superficie de crecimiento es de 151,9 cm²; de esta manera, el protocolo se puede extrapolar a células plaqueadas en cualquier otro tipo de superficie, siendo todos los cálculos lineales.

- 2 hs antes de la transfección, el medio de cultivo se reemplaza por medio completo
- La solución de plásmidos se lleva a un volumen de 1125 µl con H₂O destilada. Agregar a esta mezcla 125 µl de CaCl₂ 2,5M y mezclar con vortex. A esta mezcla, agregarle, bajo agitación con vortex, gota a gota 1250 µl de HBSS 2X. Incubar esta mezcla ADN/Ca/PO por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, agregar todo el volumen de la mezcla (2,5 ml) gota a gota, distribuyendo de la manera más homogénea posible, sobre la placa. Luego agitar la placa suavemente para que se distribuya la mezcla.
- 14-16 hs después de la transfección, reemplazar el medio por medio completo.

Retro PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La RT-qPCR se llevó a cabo a partir de ARN aislado de células HEK293 transfectadas con plásmidos. El ARN se aisló con el kit de Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la retrotranscripción, se utilizó el kit comercial Qiagen QuantiTect Reverse transcription kit (#205310), siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo con el reactivo MESA BLUE qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay Low ROX en un Sistema de qPCR Stratagene Mx3000P.

Los primers utilizados para la qPCR fueron los siguientes:

Nombre del primer	Secuencia (5'--> 3')
IGF-I for	GCTGGAGATGTACTGTGCTC
IGF-I rev	AGTGTACTTCCTTTCCTTCTCC
human bact for	GCGAGAAGATGACCCAGATC
human bact rev	CCAGTGGTACGGCCAGAGG

Inmunocitoquímica (ICQ)

Para la microscopía de inmunofluorescencia, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 48 hs después de la transfección, se lavaron 3X con PBS y fueron subsecuentemente tratadas con solución de bloqueo (Tritón X-100 0,5%; suero normal de

cabra 1,5% en PBS). Luego, fueron incubadas con anticuerpo (AC) primario contra IGF-I hecho en ratón (ab36532, Cambridge, MA, USA) diluido 1:1000 en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Luego, las células fueron lavadas 3X con PBS y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente con ACs secundarios Alexa Fluor 488 o 555 (Invitrogen) hechos en burro anti- ratón. Finalmente, las células fueron lavadas 3X con PBS y se incubaron durante 5 mins con el reactivo Hoechst 33258 (diluído 1:5000 en PBS) para teñir núcleos. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Leica DMI 6000B.

Western Blot (WB)

Para el WB, 48 hs después de la transfección las células fueron incubadas en buffer de lisis de WB por 30 mins en hielo. Luego, los lisados fueron centrifugados a 14000 rpm por 10 mins y el sobrenadante se guardó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se midió con el ensayo de Bradford (BioRad, USA); de esta manera, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Infinite M200 PRO (Tecan Ltd, Suiza). Luego, 40 µg de proteínas se mezclaron con buffer de siembra Laemmli 5X. Estas muestras se hirvieron a 95°C durante 3 mins y se sometieron a electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida 15% con SDS (SDS-PAGE) durante 2 hs a 100 V. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GR, Healthcare, Suecia) a 100 V durante una hora. La membrana fue luego bloqueada con solución de bloqueo para WB (leche descremada al 5%; Tween 0,05% en buffer TBS) por una hora a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó con AC primario anti IGF-I (1:3000 en TBS-Tween, ab36532, Cambridge, MA, USA) o anti beta actina (1:3000 en TBS-Tween, Sigma) a 4°C toda la noche. Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente con AC secundario anti ratón conjugado a Horse Radish Peroxidase (HRP) (1:10000 en TBS-Tween, Ammersham). Entre cada paso la membrana fue lavada 3X con TBS-Tween. Finalmente, la membrana se reveló con el sustrato Western Chemiluminescent HRP (Merck Millipore, USA) y visualizó con el equipo Alpha Imager (Alpha Innotech, USA).

Apéndice B. Fórmula de soluciones

Caldo LB

Tryptona 10g/L

Extracto de levadura 5 g/L

NaCl 5 g/L

LB agar

Idem caldo LB + 15g/L Agar

2xHBS (500ml)

NaCl	8.0gr
KCl	0.38gr
Na ₂ HPO ₄	0.1gr
HEPES	5.0gr
Glucosa	1.0gr

Ajustar a pH=7,05 con KOH/NaOH. Esterilizar con filtro de 0,22 µm, alicuotar en fracciones de 50 ml y congelar a -20 °C.

2.5M CaCl₂

$$PM (CaCl_2 \cdot 2H_2O) = 147.02$$

Diluir 3,68 gr en 10ml de H₂O y esterilizar con filtro de 0,22 µm, alicuotar en fracciones de 2 ml y congelar a -20 °C.

Buffer de lisis para WB

Tris HCl pH 7.6 25mM

NaCl 150mM

NP-40 1%

Deoxicolato de sodio 1%

Dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.1%

El buffer fue suplementado en el momento con el cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Alemania)

Buffer de siembra Laemmli 5X

Tris pH 6,8 250mM

SDS 10%

Azul de Bromofenol 1,25%

β -Mercaptoetanol 5%

Glycerol 50%

PB 1 M, pH 7,4

Na_2HPO_4 109 % p/v

NaH_2PO_4 32 % p/v

Solución criopreservadora de Olmos para cerebro entero

Sacarosa 30% p/v

Polivinilpirrolidona 1% p/v

Etilenglicol 30% v/v

PB 1 M 10% v/v

Lista de figuras

Capítulo	# Figura	Título	Página
1	1	Índice de envejecimiento en Argentina	18
1	2	Esquema del circuito hipocampo-EC	22
1	3	Representación de la plataforma del BM y las claves espaciales	26
1	4	Estructura del IGF-I	27
1	5	Vías de señalización de insulina, IGF-I e IGF-II	29
2	6	Diseño experimental y análisis del comportamiento en el BM	42
2	7	Morfometría de neuronas hipocámpales de animales que realizaron el entrenamiento en el BM	45
3	8	Efecto del envejecimiento sobre el aprendizaje y la retención de memoria espacial	55
3	9	Expresión de DCX e Iba-1 en el hipocampo dorsal de ratas jóvenes y viejas	56
3	10	Volumen de las regiones del hipocampo SR y DH de ratas jóvenes y viejas	57
3	11	Cambios en la expresión génica relacionados al envejecimiento en el hipocampo	61
3	12	Impronta transcriptómica de los 11 genes desregulados con el envejecimiento a lo largo de las especies	63
3	13	Expresión de los 11 genes en tumores de bajo grado	64
3	14	La sobreexpresión de Tyrobp está asociada a una menor supervivencia en pacientes con glioblastoma	65

3	15	Interacciones biológicas entre las proteínas codificadas por los miembros de la impronta transcriptómica	66
4	16	Efecto de la terapia génica con IGF-I en el desempeño de las ratas viejas en el BM	76
4	17	Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre la exploración de agujeros	77
4	18	Efecto de la terapia génica con IGF-I en la frecuencia de exploración total y de la región meta	78
4	19	Distancia recorrida	78
4	20	Expresión transgénica	79
4	21	Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre el volumen de SR y DH0	80
4	22	Expresión de DCX y GFAP en el hipocampo	81
4	23	Efecto del tratamiento con IGF-I sobre la longitud y la complejidad de las prolongaciones de los astrocitos en el SR	82
5	24	Efecto de la terapia génica de largo plazo con IGF-I sobre el desempeño de las ratas viejas en el BM	89
5	25	Expresión recombinante de DsRed e IGF-I	90
5	26	Red de genes modulados por el IGF-I	92
5	27	Modulación de la microglia por el IGF-I	93
6	28	Clonado del IGF-I en CD526A	99
6	29	Plásmido CD526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP	100
6	30	Validación del CD526A-eF1-IGF-I-T2A-GFP	100
6	31	Funcionalidad del LV-IGF-I-GFP	101
6	32	Clonado para lentivirus IGF-I-DsRed	102

6	33	Chequeo de plásmidos FuGW-DsRed y FuGW-IGF-I-DsRed	103
6	34	Validación de FuGW-DsRed y FuGW-IGF-I-DsRed	104
6	35	Clonado para RAd IGF-DsRed	105
6	36	Chequeo de plásmidos para RAds obtenidos	105
6	37	Validación de pDC511-DsRed y pDC511-IGF-I-DsRed	106
6	38	Construcción y validación del pC4HSU-IGF-I- DsRed	107
7	39	Resumen gráfico	109
7	40	Esquema de la metodología propuesta para nuestros experimentos	110

Lista de tablas

Capítulo	# Figura	Título	Página
3	1	Primers empleados para la validación de genes por RT-qPCR	52
3	2	Lista de los 20 genes más sobre y subexpresados	58
3	3	Descripción de la impronta de los 11 genes	62
5	4	Genes modulados por IGF-I validados por RT-qPCR	86
5	5	Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre genes funcionalmente relevantes en el hipocampo de ratas viejas	91